

mgr Magdalena Cieřlik

**Znaczenie czynnika indukującego apoptoz AIF
w toksycznořci peptydów amyloidu β
i w genotoksycznořci N-metyl-N'-nitro-N-
nitrozoguanidyny MNNG**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. n. med. Joanny B. Strosznajder

*Promotorowi mojej pracy - **Pani prof. dr hab. n. med. Joannie Strosznajder** składam serdecznie podziękowania za nieocenioną pomoc i opiekę w realizacji projektu. Cierpliwość i zaangażowanie Pani Profesor oraz mobilizowanie mnie do pracy, stworzyły znakomite warunki w których mogłam rozwijać się naukowo.*

*Dziękuję wszystkim **Koleżankom i Kolegom z Zakładu Komórkowej Transdukcji Sygnału** za współpracę, pomoc i niezliczone dyskusje, co umożliwiło przygotowanie tej pracy w miłej i przyjaznej atmosferze.*

*Szczególne podziękowania kieruję do **dr hab. Małgorzaty Chalimoniuk** i **dr Grzegorza Czapskiego** za merytoryczne wsparcie w rozwiązywaniu wielu skomplikowanych problemów naukowych, owocne dyskusje oraz wnikliwe i krytyczne przeczytanie manuskryptu.*

*Dziękuję także **mgr Joannie Pyszko** i **mgr Marii Jacewicz** za pomoc w realizacji wielu doświadczeń.*

*Niniejszą pracę dedykuję moim
Rodzicom i Mężowi, którzy zawsze we
mnie wierzyli i mocno mnie wspierali.*

Większość przedstawionych w tej pracy wyników stanowi treść następujących publikacji:

- ♦ Pytłowany M, Strosznajder JB, Jęsko H, Cąkała M, Strosznajder R **(2008)** Molecular mechanism of PC12 cell death evoked by nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Acta Biochim Pol* 55 (2), 339–347
- ♦ Strosznajder JB, Cieslik M, Cakala M, Jesko H, Eckert A, Strosznajder RP **(2011)** Lipoxygenases and poly(ADP-ribose) polymerase in amyloid beta cytotoxicity. *Neurochem Res.* 36(5):839-848
- ♦ Cieślik M, Pyszko J, Strosznajder JB **(2011)** Inhibitors of Poly(ADP-ribose)polymerase and docosahexaenoic acid protect hippocampal neurons against death evoked by genotoxic stress. – obecnie w przygotowaniu do publikacji w FEBS Letters

Przedstawione były również w formie licznych doniesień zjazdowych.

Badania, których wyniki przedstawiono w tej pracy były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach promotorskiego projektu badawczego nr NN401139938 oraz Sieci Naukowej MNiSW nr 28/E-32/SW005/2007 oraz nr 28/E-32/SW005/2008.

Spis treści

SPIS RYCIN	13
SPIS TABEL	16
OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY.....	17
WPROWADZENIE	21
CZYNNIK INDUKUJĄCY APOPTOZĘ AIF – INFORMACJE OGÓLNE	21
BUDOWA BIAŁKA AIF	22
RODZINA BIAŁEK AIF	23
AIF BIAŁKO NIEZBĘDNE DLA ŻYCIA	25
AIF W PROCESIE APOPTOTYCZNEJ ŚMIERCI KOMÓRKI.....	29
ZNACZENIE PAR W MECHANIZMIE UWALNIANIA AIF Z MITOCHONDRIMUM DO JĄDRA KOMÓRKI.....	31
POLIMERAZA POLI(ADP-RYBOZY)	35
CHARAKTERYSTYKA CZĄSTECZKI PAR.....	38
STRES OKSYDACYJNY I KOMPLEKS I MITOCHONDRIOW	40
TOKSYCZNOŚĆ PEPTYDÓW AMYLOIDU BETA I CHOROBA ALZHEIMERA	44
UDZIAŁ PEPTYDÓW AB W ZABURZENIU FUNKCJI MITOCHONDRIOW.....	50
TEORIA WOLNORODNIKOWA W TOKSYCZNOŚCI PEPTYDÓW AB	52
CEL	59
MATERIAŁY I METODY	60
KOMÓRKOWE MODELE BADAWCZE.....	61
<i>Linia szczurzych komórek pheochromocytoza – PC12</i>	<i>61</i>
<i>Unieśmiertelniona linia mysich neuronów hipokampa – HT22</i>	<i>62</i>
ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE	63
MODELE DOŚWIADCZALNE.....	65
<i>Model stresu oksydacyjnego wywołany: endogennie uwalnianymi peptydami amyloidu β, podaniem egzogennych peptydów Aβ oraz donorem tlenu azotu - nitroprusydkiem sodu.....</i>	<i>65</i>
FARMAKOLOGICZNA MODYFIKACJA ODPOWIEDZI KOMÓREK NA STRES OKSYDACYJNY WYWOŁANY PEPTYDAMI AB I SNP ORAZ NA STRES GENOTOKSYCZNY.	69
PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO DOŚWIADCZEŃ I ANALIZ.....	70
<i>Otrzymywanie frakcji podkomórkowych.....</i>	<i>70</i>
METODY SPEKTROFOTOMETRYCZNE.....	71
<i>Oznaczanie zawartości białka.....</i>	<i>71</i>
<i>Analiza przeżywalności komórek za pomocą testu MTT.....</i>	<i>72</i>
METODY SPEKTROFLUORYMETRYCZNE.....	73
<i>Analiza poziomu wolnych rodników w cytozolu komórek przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF </i>	<i>73</i>
<i>Badanie aktywności kaspazy-3.....</i>	<i>73</i>
<i>Oznaczanie aktywności syntazy tlenu azotu (NOS).....</i>	<i>74</i>
METODY IMMUNOCHEMICZNE	74
<i>Immunodetekcja białek metoda western blot.....</i>	<i>74</i>
<i>Oznaczanie poziomu amyloidu β 1-40 przy użyciu metody ELISA</i>	<i>76</i>

METODY RADIOCHEMICZNE	77
<i>Oznaczanie aktywnořci polimerazy poli(ADP-rybozy)</i>	77
ANALIZA EKSPRESJI GENÓW	77
<i>Izolacja RNA</i>	77
<i>Oczyszczanie RNA</i>	78
<i>Reakcja odwrotnej transkrypcji</i>	78
<i>Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR)</i>	78
BADANIE MORFOLOGII KOMÓREK ORAZ APOPTOZY PRZY ZASTOSOWANIU MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ.....	79
CHARAKTERYSTYKA ZASTOSOWANYCH ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH	80
<i>β NAD⁺ oraz inhibitory PARS-1 i PARG</i>	80
<i>Inhibitory kaspas i innych białek zaangażowanych w proces apoptozy</i>	82
INHIBITORY KINAZ	83
<i>Inhibitory kinazy PI3/Akt</i>	84
<i>Inhibitory kinaz białkowych</i>	84
<i>Kwas dokozaheksaenowy (DHA)</i>	86
<i>Inhibitor γ-sekreazy</i>	86
STATYSTYCZNE OPRACOWANIE WYNIKÓW.....	87
WYNIKI.....	89
BADANIE EKSPRESJI I POZIOMU BIAŁKA AIF W MITOCHONDRIACH ORAZ STRESU OKSYDACYJNEGO W WARUNKACH ZWIĘKSZONEJ SEKRECJI PEPTYDÓW AB, W KOMÓRKACH TRANSFEKOWANYCH GENEM LUDZKIM DLA BIAŁKA APP.	89
IMMUNOREAKTYWNOŚĆ PARS-1 W WARUNKACH STRESU OKSYDACYJNEGO WYWOŁANEGO TRANSFEKCJĄ KOMÓREK GENEM DLA BIAŁKA APP I ZWIĘKSZONYM UWALNIANIEM PEPTYDÓW AB.....	95
BADANIE WPŁYWU EGZOGENNYCH PEPTYDÓW AB 1-42 NA POZIOM STRESU OKSYDACYJNEGO, EKSPRESJĘ GENU I POZIOM BIAŁKA DLA AIF I PARS-1 ORAZ PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK PC12.....	97
<i>Analiza przeżywalności komórek PC12 i poziomu białek AIF i PARS-1 w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego egzogennym podaniem peptydów Aβ 1-42 w formie oligomerów i fibryli</i>	97
BADANIA EKSPRESJI GENU ORAZ IMMUNOREAKTYWNOŚCI BIAŁKA AIF W RÓŻNYCH CZĘŚCIACH MÓZGU MYSZY TRANSGENICZNYCH APP+/+ Z MUTACJĄ (Thy1;APP)VAL717LE.....	100
BADANIE POZIOMU I LOKALIZACJI AIF ORAZ PARS/PAR W STRESIE NITROZACYJNYM WYWOŁANYM DONOREM NO W KOMÓRKACH PC12.....	102
BADANIE WPŁYWU STRESU NITROZACYJNEGO WYWOŁANEGO DONOREM NO W KOMÓRKACH PC12 TRANSFEKOWANYCH GENEM DLA BIAŁKA APP.	110
<i>Analiza wpływu NO na przeżywalności, ekspresję i poziom białek AIF i PARS-1 w komórkach PC12 transfekowanych genem dla białka APP</i>	111
BADANIE WPŁYWU STRESU GENOTOKSYCZNEGO NA PRZEŻYCIE KOMÓRKI HT22, EKSPRESJĘ I POZIOM BIAŁKA AIF I POZIOM PAR.....	114
EFEKT INHIBITORÓW PARS-1 NA PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK PODDANYCH DZIAŁANIU STRESU GENOTOKSYCZNEGO.	120
EFEKT DZIAŁANIA POTENCJALNYCH ZWIĄZKÓW PROTEKCYJNYCH NA PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK W WARUNKACH STRESU GENOTOKSYCZNEGO.	128
WPŁYW STRESU GENOTOKSYCZNEGO NA EKSPRESJĘ GENÓW DLA BIAŁEK PRO- I ANTYAPOPTOTYCZNYCH.....	132
DYSKUSJA.....	137
PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	155
STRESZCZENIE.....	157
LITERATURA.....	163

Spis rycin

Rycina 1. Dojrzewanie i uwalnianie białka AIF	23
Rycina 2. Charakterystyczne domeny występujące w białkach ludzkich AIF, AIFL,	24
Rycina 3. Model miejscowego działania AIF w łańcuchu transportu elektronów	28
Rycina 4. Model śmierci komórki na drodze zależnej od PAR/AIF.....	34
Rycina 5. Strukturalna i funkcjonalna organizacja cząsteczki PARS-1.....	36
Rycina 6. Chemiczna struktura PAR.....	39
Rycina 7. Sekwencja wydarzeń prowadząca do neurodegeneracji w chorobie Alzheimera.....	45
Rycina 8. Proteolityczna obróbka APP.....	48
Rycina 9. Charakterystyka mutacji londyńskiej i szwedzkiej ludzkiego genu APP (wg Saftig i wsp., 1996).....	49
Rycina 10. Wpływ peptydów A β na funkcję mitochondriów.....	52
Rycina 11. Model stresu oksydacyjnego wywołanego peptydami A β	54
Rycina 12. Powstawanie i rozpad kwasu nadtlenoazotowego.....	55
Rycina 13. Neurotoksyczne działanie NO.....	56
Rycina 14. Cel pracy	60
Rycina 15. Złogi wewnątrzkomórkowego A β w komórkach transfekowanych APP typu dzikiego (APPwt) oraz genem z mutacją szwedzką (APPsw).....	62
Rycina 16. Zdjęcie komórek HT22	63
Rycina 17. Genotypowanie myszy z APP	64
Rycina 18. Zdjęcia monomerów, oligomerów i fibryli amyloidu β przygotowanych wg metody opisanej przez a i wsp. (2002)	66
Rycina 19. Nitroprusydek sodu – SNP (pentacyjanonitrozyłozelazian (2) disodowy) ...	67
Rycina 20. N-metylo-N-nitro-N-nitrozoguanidyna, MNNG.....	68
Rycina 21. Efekty działania czynnika alkilującego DNA - MNNG w komórce	68
Rycina 22. Analiza czystości frakcji subkomórkowych	71
Rycina 23. Zasada działania testu MTT	72
Rycina 24. Wzory chemiczne inhibitorów PARP-1 (PJ 34 i 3-AB).....	80
Rycina 25. Wzór chemiczny inhibitora PARG – ADP-HDP	81

Rycina 26. Wzory chemiczne antybiotyków (tertracyklin) – potencjalnych inhibitorów PARS-1	82
Rycina 27. Wzory chemiczne związków, które są inhibitorami procesu apoptozy	83
Rycina 28. Wzory chemiczne związków będących inhibitorami ścieżki sygnałowej PI-3 kinazy	84
Rycina 29. Wzory chemiczne kinaz białkowych.....	85
Rycina 30. Wzór chemiczny kwasu DHA.....	86
Rycina 31. Wzór chemiczny inhibitor γ -sekreazy.....	86
Rycina 32. Poziom uwalnianych peptydów A β 1-40 w komórkach PC12 kontrolnych i transfekowanych genem dla białka APP (APPwt i APPsw) oraz wpływ inhibitora γ -sekreazy.....	91
Rycina 33. Wpływ peptydów A β komórek transfekowanych APP na aktywność syntazy tlenu azotu (NOS)	92
Rycina 34. Poziom wolnych rodników, immunoreaktywność AIF oraz przeżywalność komórek PC12 kontrolnych i transfekowanych genem dla białka APP.....	94
Rycina 35. Aktywność, immunoreaktywność i poziom ekspresji genu dla PARS-1 w komórkach PC12 charakteryzujących się różnym poziomem sekrecji peptydów A β 1-40	96
Rycina 36. Zależny od stężenia wpływ oligomerów A β 1-42 na przeżywalność komórek PC12.....	98
Rycina 37. Wpływ oligomerów A β na poziom wolnych rodników w komórkach PC12	99
Rycina 38. Wpływ oligomerów A β 1-42 na immunoreaktywności AIF w komórkach PC12	100
Rycina 39. Ekspresja genu i poziom immunoreaktywności AIF u myszy FVB APP ^{-/-} i APP ^{+/+}	102
Rycina 40. Wpływ stresu nitrozacyjnego wywołanego 100 μ M SNP na przeżywalność i poziom immunoreaktywności AIF w komórkach PC12	104
Rycina 41. Wpływ stresu nitrozacyjnego wywołanego 500 μ M SNP na przeżywalność i poziom immunoreaktywności AIF w komórkach PC12	105
Rycina 42. Wpływ donora tlenu azotu (SNP) na poziom immunoreaktywności i aktywność PARS-1	107
Rycina 43. Wpływ stresu oksydacyjnego wywołanego SNP na poziom immunoreaktywności cytochromu c i aktywność kaspazy 3.....	109
Rycina 44. Wpływ NO uwalnianego przez SNP na przeżywalność komórek transfekowanych genem dla białka APP	111
Rycina 45. Wpływ stresu nitrozacyjnego wywołanego SNP na poziom immunoreaktywności AIF w komórkach PC12 transfekowanych genem dla białka APP.....	112

Rycina 46. Wpływ stresu oksydacyjnego wywołanego SNP na aktywność PARS-1 w komórkach PC12 transfekowanych APP.....	113
Rycina 47. Przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego	115
Rycina 48. Wpływ stresu genotoksycznego na immunoreaktywność AIF i PAR	117
Rycina 49. Wpływ inhibitorów PARS-1 na immunoreaktywność AIF we frakcji mitochondrialnej w warunkach stresu genotoksycznego	119
Rycina 50. Wpływ inhibitorów PARS-1 na przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG.....	121
Rycina 51. Wpływ inhibitorów PARS-1 podanych przed i po MNNG na przeżywalność komórek HT22	122
Rycina 52. Wpływ antybiotyków z grupy tetracyklin na przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG.....	124
Rycina 53. Wpływ antybiotyków z grupy tetracyklin na poziom immunoreaktywności i ekspresję genu dla AIF w komórkach HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG.....	126
Rycina 54. Wpływ inhibitora PARG na przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG.....	127
Rycina 55. Wpływ inhibitorów kinaz białkowych oraz kalpajny na przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego	129
Rycina 56. Wpływ DHA na przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG	130
Rycina 57. Wpływ związków o charakterze protekcyjnym na przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG	131
Rycina 58. Wpływ inhibitora PI3-Koraz PARS-1 na przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG.....	132
Rycina 59. Wpływ stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG na poziom ekspresji genu dla Bcl-2 w komórkach HT22	133
Rycina 60. Wpływ stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG na poziom ekspresji genu dla Bcl-XL w komórkach HT22	134
Rycina 61. Wpływ stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG na poziom ekspresji genu dla Bax w komórkach HT22	135
Rycina 62. Wpływ stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG na poziom ekspresji genu dla Nos2 w komórkach HT22	136

Spis tabel

Tabela 1. Rodzina biaćek PARS.....	35
Tabela 2. Reaktywne formy tlenu – charakterystyka.....	41
Tabela 3. Głównie reaktywne formy azotu – charakterystyka	42
Tabela 4. Warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych oznaczeń	75

Objařnienia skrótów stosowanych w pracy

λ	-	długość fali
3-AB	-	3-aminobenzamid
4HNE	-	4-hydroksynonenal
$\cdot O_2^-$	-	anionorodnik ponadtlenkowy
Aβ	-	amyloid beta
AD	-	choroba Alzheimerera (ang. <i>Alzheimer Disease</i>)
ADP	-	adenozynodifosforan
AIF	-	czynnik indukujący apoptozę (ang. <i>apoptosis inducing factor</i>)
AIF-exB	-	izoforma AIF, która w miejscu egzonu 2 zawiera alternatywny egzon 2b
AIF-sh	-	izoforma AIF o krótszej budowie (ang. <i>short AIF</i>)
ALA	-	kwas α -linolenowy
APP	-	β -amyloid precursor protein - białko prekursorowe amyloidu beta
APPsw	-	komórki transfekowane genem dla APP z mutacją typu szwedzkiego
APPwt	-	komórki transfekowane genem dla APP dzikiego typu
ATP	-	adenozynotryfosforan
BACE1	-	β -sekretaza
BER	-	naprawa przez wycięcie zasady (ang. <i>base excision repair</i>)
BSA	-	albumina bydlęca surowicza
CsA	-	cyklosporyna A
DCF	-	2',7'-dichlorofluoresceina
DCFH	-	2',7'-dichlorofluorescyna
DMEM	-	pożywka Dulbecco zmodyfikowana przez Eagle'a (ang. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DMSO	-	dimetylosulfotlenek
DNA	-	kwas dezoksyrybonukleinowy
DSB	-	dwuniciowe uszkodzenie DNA (ang. <i>base excision repair</i>)
DTT	-	ditiotretiol
ECL	-	chemiluminescencja (ang. <i>electrogenerated chemiluminescence</i>)
EDTA	-	sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
EGTA	-	kwasy etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetraoctowy
EPA	-	kwasy ekozapentaenowy

ERK	- kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. <i>extracellular signal regulated kinase</i>)
FAD	- dinukleotydz flawinoadeninowy
FCS	- płodowa surowica cielęca
g	- przyspieszenie ziemskie (grawitacja)
H₂DCF	- 2',7'-dwuchlorodwuhydrofluoresceina
H₂DCF-DA	- dwuoctan 2',7-dichlorodwuhydrofluoresceiny
HS	- surowica końska
HT22	- unieśmiertelnione mysie komórki hipokampa
iNOS	- indukowana izoforma syntazy tlenu azotu
KA	- kwas arachidonowy
kpb	- kilo par zasad (ang. <i>kilo base pair</i>)
kDa	- kilo Daltony, jednostka masy cząsteczkowej białka
MAPK	- kinaza MAP
MDA	- dialdehyd malonyłowy
MLS	- sekwencja lokalizacji mitochondrialnej (ang. <i>mitochondrial localization sequence</i>)
MMS	- sulfonian etylowy
MNNG	- N-metyl-N-nitro-N-nitrozoguanidyna
MNU	- metylonitrozomocznik
MOMP	- zewnętrzna błona mitochondrialna
MPT	- megakanał mitochondrialny (ang. <i>mitochondrial permeability transition</i>)
MTT	- bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowy
NAD	- dinukleotydz nikotynamidoadeninowy
NADH	- dinukleotydz nikotynoadeninowy, postać zredukowana
NER	- naprawa przez wycinanie nukleotydzów (ang. <i>nucleotide excision repair</i>)
NFκB	- czynnik jądrowy kappa B (ang. <i>nuclear factor kappa B</i>)
NGF	- czynnik wzrostu neuronów (ang. <i>neuronal growth factor</i>)
NLS	- sekwencja lokalizacji jądrowej (ang. <i>nuclear localization sequence</i>)
NMDA	- N-metylo-D-asparaginian
NO	- tlenek azotu
NOS	- syntaza tlenu azotu
NPDA1	- neuroprotektyna D1 – 10,17-dokozatrien
ONOO⁻	- nadtlenoazotyn
OUN	- ośrodkowy układ nerwowy

PAR	- polimery poli(ADP-rybozy)
PARG	- glikohydrolaza poli(ADP-rybzy)
PARS-1	- syntaza poli(ADP-rybozy) typu1, znana r3wnieř jako polimeraza (PARP-1)
PBS	- bufor fosforanowy – buforowany roztw3r soli fizjologicznej
PC12	- kom3rki chromochłonne guza nadnerczy (ang. <i>Pheochromocytoma</i>)
PCR	- reakcja łanuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCD	- programowana śmierć kom3rki (ang. <i>programmed cell death</i>)
PI3-K	- kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
PJ-43	- chlorowodorek N-(6-okso-5,6-dihydrofenantrydyn-2-yl)-(N,N-dimetylamino)acetamidu
PKC	- kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i>)
PKG	- kinaza białkowa G (ang. <i>protein kinase G</i>)
PVDF	- polifluorek winylidenu
RFA	- reaktywne formy azotu
RFT	- reaktywne formy tlenu
SB	- odczynnik do denaturacji białek (ang. <i>sample buffer</i>)
SDS	- dodecylosiarczan sodowy
SEM	- bład standardowy średniej
siRNA	- małe interferujące RNA (ang. <i>small interfering RNA</i>)
SNP	- nitroprusydek sodu
SOD	- peroksydaza ponadtlenkowa
TBS	- bufor o składzie 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH doprowadzone kwasem solnym do 7,6
TGS	- tris-Glicyna-SDS
TEMED	- N,N,N',N'tetrametylenodiamina
Tris	- tris(hydroksymetylo)aminometan
VDAC	- kanał anionowy zależny od napięcia (potencjału) (ang. <i>voltage dependent anion channel</i>)
Z-DEVD-FMK	- keton Z-Asp(O-Me)-Glu(O-Me)-Val-Asp(O-Me)fluorometylowy

Wprowadzenie

Czynnik indukujący apoptozę AIF – informacje ogólne

W prowadzonych na szeroką skalę badaniach nad programowaną śmiercią komórki PCD (ang. *Programmed Cell Death*) grupa Guido Kroemera (Susin i wsp., 1999) zidentyfikowała czynnik indukujący apoptozę AIF (ang. *apoptosis inducing factor*), kluczowe białko pro-apoptotyczne w szlaku sygnałowym apoptozy niezależnej od kaspaz.

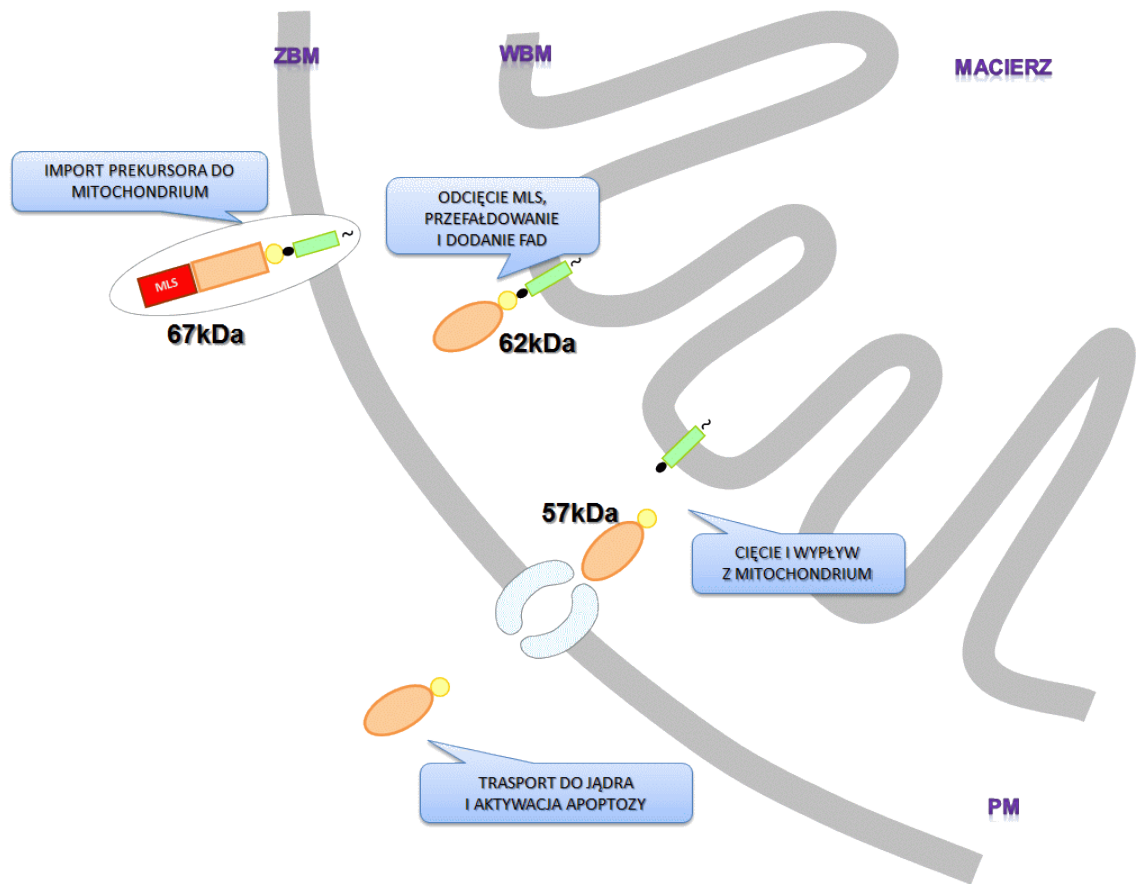
Kolejne prace wykazały, że AIF to mitochondrialna flawoproteina bardzo silnie konserwowana filogenetycznie, która przyczynia się zarówno do przeżycia jak i śmierci komórki (Susin i wsp., 1999; Boujard i wsp., 2007; Krantic i wsp., 2007). W warunkach fizjologicznych AIF odgrywa istotną rolę w fosforylacji oksydacyjnej (Joza i wsp., 2001, 2005), a w odpowiedzi na procesy patologiczne może prowadzić do kaspazo-niezależnej śmierci komórki, poprzez translokacje do jądra, kondensacje chromatyny i fragmentację DNA (Susin i wsp., 1999). Dokładny mechanizm śmierci komórki zależnej od AIF pozostaje jednak nadal niejasny.

AIF zakotwiczony jest w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, jego N-terminalny koniec skierowany jest do macierzy mitochondrialnej, a C-terminalny region znajduje się w przestrzeni międzybłonowej (Otera i wsp., 2005). W budowie AIF można wyróżnić trzy funkcjonalne domeny: domenę wiążącą FAD, domenę wiążącą NADH oraz domenę C-końcową. Dwie pierwsze z nich wykazują właściwości oksydoreduktazy NADH i w fizjologicznych warunkach biorą udział w transporcie elektronów jako składowe kompleksu I i prawdopodobnie także III kompleksu łańcucha oddechowego. Natomiast domena C-końcowa wykazuje właściwości proapoptotyczne. Dodatkowo struktura krystaliczna AIF pokazała, że na powierzchni białka znajdują się dodatnio naładowane aminokwasy, które oddziałują elektrostatycznie z DNA.

Wiązanie DNA i jego kondensacja przez AIF wymaga obecności jonów Mg^{2+} i jest stymulowane przez $NADP^+$ (Modjtahedi i wsp., 2006; Vahsen i wsp., 2004). Wydaje się, że AIF jest głównym czynnikiem prowadzącym do śmierci komórki w szlaku przekaźnictwa związanego z syntazą poli(ADP-rybozy) (PARS-1). Wy-suwane są hipotezy jakoby śmierć ta różniła się od innych rodzajów programo-wanej śmierci komórki, takich jak apoptoza, nekroza czy autofagia (Wang i wsp., 2009a, b). Wobec powyższego zaproponowana została osobna nazwa dla śmierci komórki zależnej od AIF/PARS-1 – partanatos. Nazwa ta wywodzi się od poli(ADP-rybozy) (PAR) i imienia greckiego boga śmierci Tanatosa. Ten rodzaj śmierci charakteryzuje się zależnym od PAR uwalnianiem AIF z mitochondrium do jądra komórki (Andrabi i wsp., 2008; Wang i wsp., 2009a, b; David i wsp., 2009).

Budowa białka AIF

Gen ludzkiego AIF jest ulokowany na chromosomie X i składa się z 16 ek-sonów. W wyniku translacji w cytoplazmie powstaje białko prekursorowe o długości 613 aminokwasów (67 kDa). Następnie, dzięki zlokalizowanej na N-końcu sekwencji MLS (ang. *mitochondrial localization sequence*), kierowane jest do mitochondrium, gdzie w dalszej kolejności MLS zostaje odcięte przez odpowiednie peptydazy. Dodatkowo, w trakcie przeładowania białka, dodany zostaje kofaktor FAD i w ten sposób powstaje dojrzały 62 kDa AIF, który lokuje się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (**rycina 1**) (Susin i wsp., 1999).



Rycina 1. Dojrzewanie i uwalnianie białka AIF

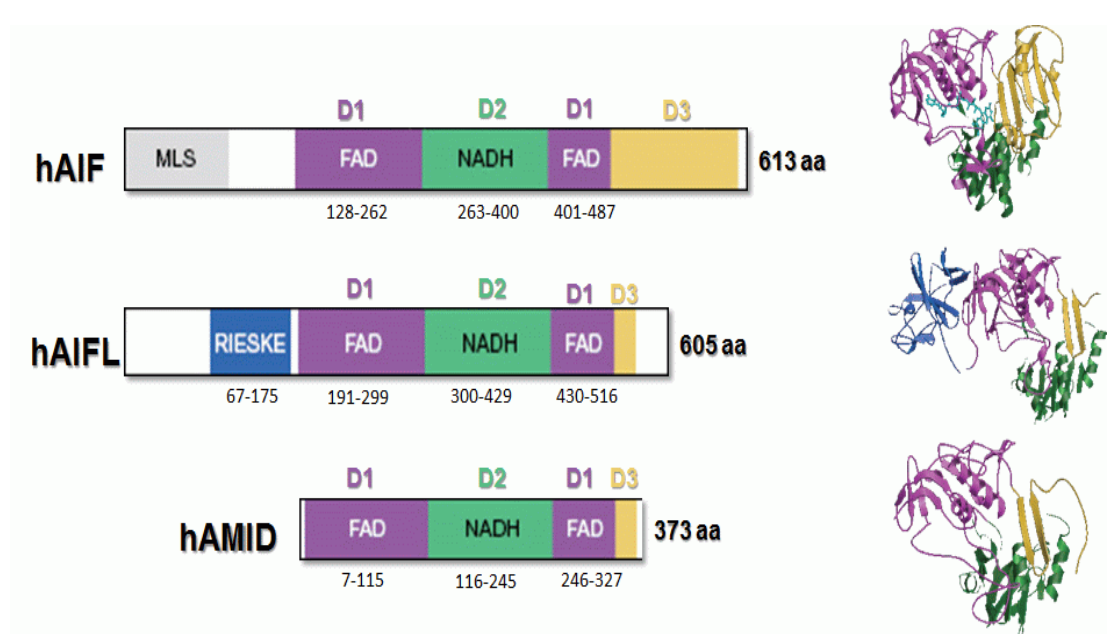
Prekursor białka AIF 67 kDa importowany jest do mitochondriów dzięki domenie lokalizacji mitochondrialnej MLS. Przed zakotwiczeniem w wewnętrznej błonie mitochondrialnej od prekursora AIF odcinana jest domena MLS i białko 62 kDa zostaje przefalutowane a po dodaniu FAD zakotwicza się w błonie i osiąga formę dojrzałą. W odpowiedzi na sygnał proapoptotyczny odcięty zostaje fragment AIF 57 kDa. Jest on transportowany do jądra, gdzie bierze udział w kondensacji i fragmentacji chromatyny, prowadząc do programowanej śmierci komórki (wg Modjtahedi i wsp., 2006; Wenfeng i wsp., 2011)

ZBM - zewnętrzna błona mitochondrialna, PM - przestrzeń międzybłonowa, WBM - wewnętrzna błona mitochondrialna

Rodzina białek AIF

Początkowy okres badań nad AIF zaowocował opisaniem ludzkiego i mysiego białka (Susin i wsp., 1999). Oba należą do rodziny białek AIF i charakteryzują się podobną strukturą, aktywnością redoks oraz aktywnością proapopto-

tyczną. Do tej rodziny należy: ludzki AMID (nazywany również PRG3, o długości 373 aminokwasów, podobnie sfałdowany jak AIF. Jednak ze względu na brak domeny MLS nie znajduje się w mitochondriach a jego kofaktorem jest 6-hydroksy FAD), a także AIFL (o długości 605 aminokwasów, także nieposiadający sekwencji MLS, jednak w jego budowie opisano dodatkową domenę Rieske). Charakterystyczne domeny wspomnianych białek przedstawione są na **rycinie 2**. Dodatkowo, białko AIF1 zidentyfikowano zostało u *Saccharomyces cerevisiae*. Jest ono filogenetycznie podobne do ludzkiego AIF, AIFL i AMID (Modjahedi i wsp., 2006).



Rycina 2. Charakterystyczne domeny występujące w białkach ludzkich AIF, AIFL, AMID (wg Modjtahedi i wsp., 2006)

Ponadto scharakteryzowane zostały trzy dodatkowe izoformy białka AIF:

- **AIF-exB** – powstałe przez alternatywne zastąpienie eksonu 2 eksonem 2b. Jest ono białkiem długości 603 aminokwasów, czyli jest niewiele krótsze od normalnego AIF i zawiera domenę MLS, a także NLS (ang. *Nuclear Localization Sequence*) kierującą do jądra. W warunkach fizjologicznych, podobnie jak AIF, białko to znajduje się w mitochondrium, natomiast w odpowiedzi na sygnał proapoptyczny jest translokowane do jądra.

- **AIF-sh** (AIF short) – składające się z siedmiu eksonów. Jest białkiem o długości 261 aminokwasów. Posiada tylko domenę NLS i dlatego w normalnych warunkach AIF-sh zlokalizowane jest w cytoplazmie i może translokować się do jądra.

- **AIF-sh2, AIF-sh3** (AIF short 2, 3) – powstaje przez alternatywne wykorzystanie nowo odkrytego eksonu 9b (znajdującego się między eksonami 9 i 10, a wcześniej uznawany za intron). AIFsh-2 w fizjologicznych warunkach znajduje się w mitochondrium i prawdopodobnie bierze udział w transporcie elektronów w kompleksie I łańcucha oddechowego. Ze względu na brak domeny NLS nie może być translokowane do jądra (Krantic i wsp., 2007).

Dodatkowo wyniki badań wykazały tkankową i narządową specyficzność izoform AIF. Zostało między innymi stwierdzone, że ekspresja AIF-sh nie zachodzi w mózgu i tarczycy, natomiast obserwuje się ją w sercu, skórze, jajnikach, mięśniach, nerkach i wątrobie (Delettre i wsp., 2006).

AIF białko niezbędne dla życia

Badania na zwierzętach transgenicznych Harlequin (Hq) przyniosły pierwsze dowody świadczące, że AIF jest białkiem o „podwójnym obliczu”. W warunkach fizjologicznych jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów, w tym dla prawidłowej fosforylacji oksydacyjnej. Natomiast w warunkach wzmożonego stresu oksydacyjnego czy genotoksycznego może być uwalniane i translokowane do jądra, gdzie uczestniczy w kondensacji i fragmentacji chromatyny, prowadząc do śmierci apoptotycznej komórki (Susui i wsp., 1999; Arnoult i wsp., 2002; Modjtahedi i wsp., 2006).

Myszy Hq to mutanty z krótką sierścią charakteryzujące się postępującą ataksją i ślepotą spowodowaną degeneracją neuronów (Bronson i wsp., 1990). Jak wykazały kolejne badania, myszy te charakteryzuje również znacznie obniżony poziomem ekspresji AIF do 10-20% w porównaniu z zwierzętami kontrolnymi. Mutacja odpowiedzialna za ten deficyt nazwana została AIFHq i spowodowana jest retrowirusową insercją w pierwszym intronie genu AIF. Klein i wsp. (2002) zwrócili uwagę, że utrata aktywnego białka AIF jest bezpośrednio

związana z neurodegeneracją. Dodatkowo wykazali, iż AIF jest niezbędny dla przeżycia postmitotycznych neuronów w starzejącym się mózgu. Niewyjaśnionym pozostało, dlaczego obniżenie pro-apoptotycznego białka skutkowało degeneracją neuronów u tych zwierząt. Rozwiązanie zagadki przyniosło odkrycie molekularnego, strukturalnego i biochemicznego oblicza białka AIF.

Krystalograficzne badania pokazały, że AIF posiada domenę oksydoreduktazy, przypominającą bakteryjną podjednostkę reduktazy ferrodoksynowej NADH. Aktywność oksydoreduktazy tego białka wykazano również w doświadczeniach *in vitro* zarówno na białku normalnym, jak i jego rekombinowanej formie (Miramar i wsp., 2001; Mate i wsp., 2002). Stąd też AIF sklasyfikowane zostało do klasy oksydoreduktaz, podklasy NADH-reduktaz przenoszących elektrony, gdyż szybko reaguje z tlenem tworząc $O_2^{\cdot -}$ oraz neutralny rodnik flawo-proteinowy (Miramar i wsp., 2001). Dane strukturalne wykazały także, że AIF wykorzystuje wewnętrzną cząsteczkę FAD, a nie wewnątrzcząsteczkowy mostek disiarczkowy (znaleziony w homologicznych enzymach) i transportuje elektrony bez udziału grup cysteinowych (Miramar i wsp., 2001; Mate i wsp., 2002). Ponadto AIF, inaczej niż inne enzymy tego typu, jest aktywny enzymatycznie jako monomer, podczas gdy inne działają jako dimery lub tetramery.

Jak już zostało zaznaczone, AIF wydaje się być niezbędny dla prawidłowej fosforylacji oksydacyjnej. Vahsen i wsp. (2004) dowodzą, że obniżona fosforylacja oksydacyjna w siatkówce i niektórych częściach mózgu myszy Hq może korelować ze spadkiem ekspresji białek wchodzących w skład podjednostek kompleksu I łańcucha oddechowego. Badacze ci stwierdzili również, że inhibicja ekspresji AIF u ludzi i myszy przez homologiczną rekombinację lub użycie siRNA, powoduje znaczną redukcję ekspresji kompleksu I oraz obniżenie jego aktywności.

Do chwili obecnej nie jest jednak w pełni wyjaśnione, jak niedobór AIF upośledza fosforylację oksydacyjną w komórkach ssaczych. Defekt oddechowy w kompleksach I i III jest łączony ze zmniejszeniem ilości białek będących częścią tych kompleksów (Vahsen 2004).

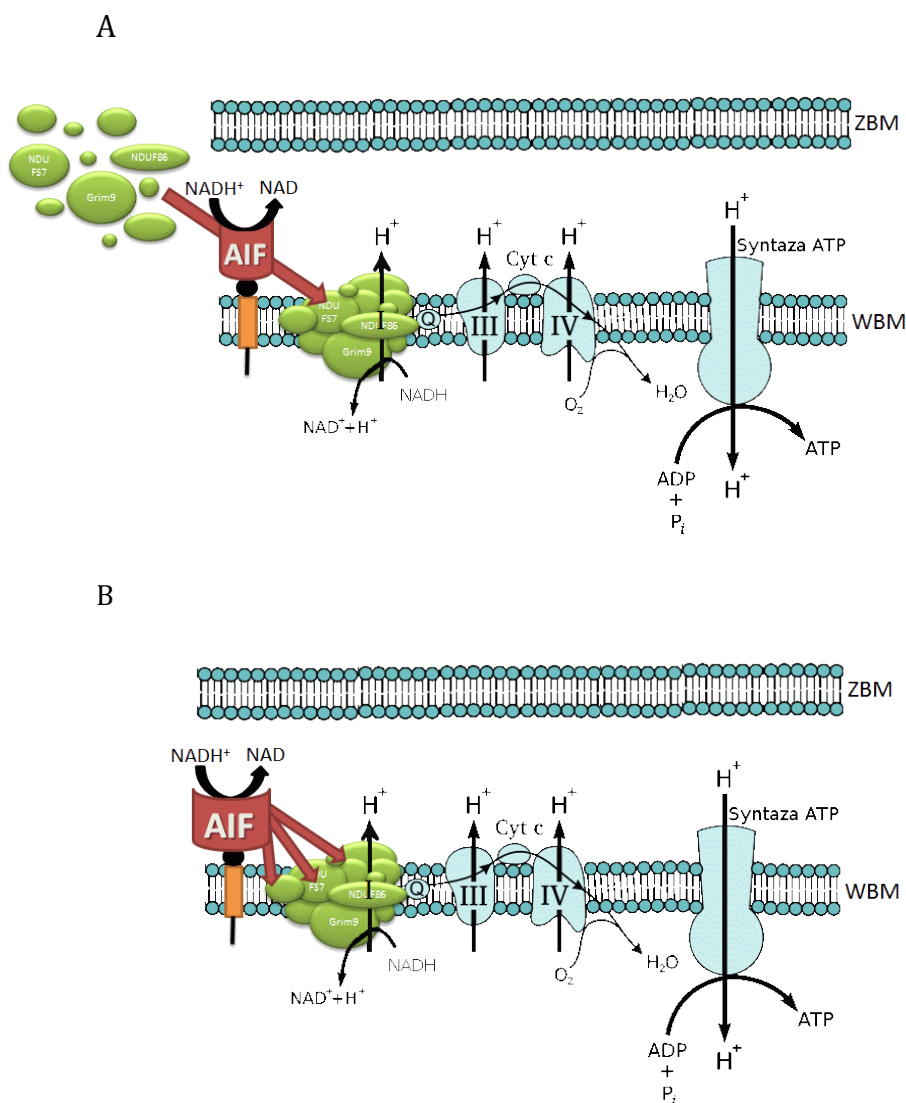
Dodatkowo okazało się, że funkcja proapoptotyczna oraz aktywność oksydo-reduktazy AIF działają niezależnie od siebie. Wskazuje na to fakt, że usunięcie FAD nie zmniejsza proapoptycznych właściwości AIF. Kolejne badania potwierdzają, że AIF jest białkiem bifunkcyjnym (Krantic i wsp., 2006; Boujard i wsp., 2007; Modjtahedi i wsp., 2009; Wenfeng i wsp., 2011).

Badania prowadzone przez Kleina i wsp., (2002) wykazały, że niska ekspresja AIF u myszy Hq wpływa na zaburzenie homeostazy wolnorodnikowej, co w konsekwencji prowadzi do stresu oksydacyjnego w komórkach nerwowych. Zaobserwowano wzrost peroksydacji lipidów, jak również wzrost aktywności katalazy i reduktazy glutationowej, natomiast aktywność peroksydazy ponadtlenkowej (SOD) nie zmienia się w badanych regionach mózgu myszy Hq (Klein i wsp., 2002). Dodatkowo wykazane zostało, że AIF posiada wysoką homologię strukturalną z reduktazą glutationową, znaną dobrze jako jeden z głównych elementów obronnych przed H_2O_2 w systemie obrony glutationowej. Sugeruje to, że obniżony poziom AIF u zwierząt Hq wpływa na zwiększenie poziomu stresu oksydacyjnego przez bezpośrednią lub pośrednią regulację poziomu H_2O_2 (Klein i Acerman, 2003).

Stąd też wydaje się, że AIF posiada właściwości enzymu antyoksydacyjnego, na co wskazuje również krystalograficzna analiza struktury tego białka. AIF prawdopodobnie obniża poziom reaktywnych form tlenu (RFT) przez zaangażowanie w biogenezę i utrzymanie stabilności kompleksu I i prawdopodobnie III łańcucha oddechowego oraz regulację poziomu glutationu.

Dostępne dane wskazują, że AIF jest niezbędny dla utrzymania prawidłowej struktury mitochondrium (Cheung i wsp., 2006). Przy jego deficycie widoczne jest zmniejszenie liczby grzebieni mitochondrialnych oraz ich obkurczenie. Dodatkowo także u myszy Hq obserwuje się zmiany neurodegeneracyjne, m.in. ślepotę (dochodzi do degeneracji siatkówki). Neurodegeneracja jest łączona z zaburzeniami molekularnymi i morfologicznymi neuronów oraz ich obumieraniem na drodze apoptozy. Sugeruje się więc, że AIF pełni funkcję wewnętrznego cytoprotektora.

Istnieją dwa hipotetyczne modele miejscowego działania AIF w łańcuchu transportu elektronów (**rycina 3**). Pierwszy model zakłada, że AIF jest czynnikiem „integrującym” (ang. *assembly factor*). Zaangażowany jest on w przeniesienie lub gromadzenie 46 podjednostek białkowych kompleksu I, a także prawdopodobnie i kompleksu III. Druga hipoteza przedstawia AIF jako czynnik utrzymujący (ang. *maintenance factor*). W modelu tym AIF jest niezbędny do utrzymania oraz stabilności kompleksu I i III (Modjtahedi i wsp., 2006).



Rycina 3. Model miejscowego działania AIF w łańcuchu transportu elektronów

A) Funkcja AIF jako czynnika integrującego – „przywołuje” i gromadzi wszystkie podjednostki białkowe kompleksu I i prawdopodobnie III łańcucha transportu elektronów

B) Funkcja AIF jako czynnika utrzymującego – utrzymuje i stabilizuje podjednostki białkowe kompleksu I i III łańcucha transportu elektronów (wg Modjtahedi i wsp., 2006)

AIF w procesie apoptotycznej śmierci komórki

AIF został zidentyfikowany przez Kromera i współpracowników w 1999 r., jako białko indukujące apoptozę w sposób niezależny od kaspaz. Struktura krystaliczna AIF wykazała na jego powierzchni dodatni potencjał elektrostatyczny, który wydaje się być odpowiedzialny za zdolność tego białka do wiązania się z DNA w sposób niezależny od sekwencji (Ye i wsp., 2002). Nadekspresja AIF (przy braku innych czynników proapoptotycznych) nie wpływa na zainicjowanie procesu apoptozy, podobnie jak usunięcie AIF z komórki nie zawsze zatrzymuje jej przebieg, gdyż programowana śmierć komórki może również odbywać się na innej drodze. Apoptoza zależna od AIF przebiega typowo

z udziałem energii. Wyjaśnianie zdarzeń molekularnych, prowadzących do uwolnienia AIF z mitochondrium i w konsekwencji jego translokacji do jadra, jest głównym celem licznych badań, które zmierzają do lepszego zrozumienia mechanizmów apoptozy i innych form programowanej śmierci komórki. Początkowe odkrycia na tym polu doprowadziły do polemiki dotyczącej uwalniania AIF z mitochondrium. Zastanawiano się czy proces ten jest zależny czy niezależny od kaspaz. Większość badań dowodzi, że uwolnienie AIF nie wymaga aktywacji proteaz cysteinowych (Susin i wsp., 1999; Yu i wsp., 2002). Jednakże Arnoult i wsp. (2002, 2003) donoszą, że inhibicja kaspaz zapobiega uwolnieniu AIF z mitochondrium. U źródła tej rozbieżności może leżeć różnica w mechanizmie uwalniania AIF, który może być zależny od typu komórek oraz specyfiki stymulacji ich śmierci (Cregan i wsp., 2004). Ostatnie badania dowodzą, że AIF umieszczony w wewnętrznej błonie mitochondrialnej jest odcinany od niej tak, aby stał się rozpuszczalnym proapoptycznym białkiem, które może być uwolnione z mitochondrium (Otera i wsp., 2005). Odcięcie od wewnętrznej błony mitochondrialnej jest obecnie przedmiotem wielu badań i wydaje się być zależne od Ca^{2+} i katalizowane przez cysteinowe proteazy: kalpaine I (zlokalizowaną w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium) oraz prawdopodobnie też katepsyny B, L i S (Cao i wsp., 2007; Krantic i wsp., 2007; Norberg i wsp., 2008, 2010). Jednak badania grupy Joshi i współpracowników w 2009r. pokazały, iż mimo wielu dowodów wskazujących na udział kalpainsy w tym procesie,

bezpośrednie eksperymenty z udziałem specyficznych inhibitorów kalpajny – kalpastatyny i PD150606, nie pozwoliły całkowicie potwierdzić tej tezy. Powstały 57 kDa AIF to forma rozpuszczalna, zlokalizowana w przestrzeni międzybłonowej, która dalej jest uwalniana z mitochondrium.

W układzie nerwowym uwalnianie AIF jest obserwowane w wyniku urazów, hipoksji, niedotlenienia i niedokrwienia mózgu, a także innych zjawisk, którym towarzyszy stres oksydacyjny czy genotoksyczny (Cao i wsp., 2003). Dotychczas zostało opisanych kilka hipotez dotyczących uwalniania AIF z mitochondrium i translokacji do jądra.

Pierwsza z nich zakłada tworzenie się w błonie mitochondrialnej porów o małej średnicy, powstałej przez oligomeryzację proapoptycznego białka z rodziny Bcl-2 (BAK oraz BAX) (Sharpe i wsp., 2004). Powoduje to zmianę potencjału błony mitochondrialnej, a w dalszej kolejności może prowadzić do aktywacji kaspaz i obrzęku mitochondriów. Powstały mega kanał mitochondrialny i uprzepuszczeliona zewnętrzna błona mitochondrialna (MOMP) umożliwiają uwolnienie AIF i cytochromu c oraz kolejnych białek proapoptycznych.

W alternatywnym modelu, który dotyczy również uwalniania cytochromu c, już na początku formują się większe pory w błonie mitochondrialnej, co umożliwia bezpośrednie uwolnienie AIF. Większe pory mogą powstać przez interakcje proapoptycznego białka należącego do rodziny Bcl-2 z białkami błony mitochondrialnej, tworząc kanał anionowy zależny od potencjału (ang. *voltage dependent anion channel* – VDAC) (Shimizu i wsp., 1999). Procesowi temu może towarzyszyć obrzęk mitochondriów oraz zwiększenie przepuszczalności MOMP.

Znaczenie PAR w mechanizmie uwalniania AIF z mitochondrium do jądra komórki

Obecnie istotne znaczenie przypisuje się poli(ADP-rybozie) PAR, nowej cząsteczce sygnalizacyjnej, która może wpływać na uwalnianie AIF. Zależność między syntazą poli(ADP-rybozy) PARS-1 i AIF została pierwszy raz opisana przez Susina i wsp. (1999). Enzym jądrowy PARS katalizuje reakcje z NAD^+ i syntetyzuje polimer ADP-rybozę PAR. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA, na przykład przez RFT, komórka rozpoczyna procesy naprawcze. Następuje aktywacja PARS-1 i poli(ADP-rybozy)lacja histonów, co doprowadza do ich uwolnienia z uszkodzonego DNA. W wyniku tego procesu uszkodzona nić DNA zostaje udostępniona enzymom naprawczym z kompleksu BER (ang. *Base Excision Repair - naprawa przez wycięcie zasady*) lub NER (ang. *Nucleotide Excision Repair - naprawa przez wycinanie nukleotydów*). Jedno, lub dwuniciowe uszkodzenie DNA komórki zostaje naprawione i komórka przeżywa. Jednakże, kiedy dojdzie do masywnego uszkodzenia DNA, następuje nadaktywacja PARS-1, co może prowadzić do wyczerpania βNAD^+ i ATP oraz śmierci komórek.

To, w jaki sposób aktywowany w jądrze enzym przekazuje informację do mitochondrium, jest jednym z głównych pytań zadawanych przez wiele grup badawczych. Pierwsza hipoteza zakładała, że PARS-1 może mieć również lokalizację mitochondrialną, jednak dość szybko została odrzucona w związku z brakiem potwierdzenia na obecność PARS-1 w tych organellach (Yu i wsp., 2002; Cipriani i wsp., 2005 i niepublikowane badania własne). Na podstawie znajomości mechanizmu reakcji katalizowanej przez PARS-1 oraz wiedzy na temat produktu owej reakcji, zaproponowano dwie kolejne hipotezy potencjalnej drogi uwalniania AIF z mitochondrium do jądra. Pierwsza z nich bierze pod uwagę spadek mitochondrialnej puli βNAD^+ wykorzystywanego przez PARS-1. Natomiast druga zakłada, że w proces ten zaangażowany jest polimer PAR (Wang i wsp 2009a, b).

Związana ze wzmożonym stresem oksydacyjnym/genotoksycznym i uszkodzeniem DNA aktywacja PARS-1 oraz spadek poziomu βNAD^+ wydaje się

mieć istotne znaczenie w kontekście chorób neurodegeneracyjnych. Jednak nie udało się określić ścisłego związku pomiędzy spadkiem ilości β NAD⁺ w komórce a translokacją białka AIF z mitochondrium do jądra. Inkubacja wyizolowanych mitochondriów w buforze z obniżoną pulą β NAD⁺ nie miała wpływu na uwalnianie AIF. Dlatego też hipoteza zależnego od stanu energetycznego uwalniania AIF nie została potwierdzona (Yu i wsp., 2004, 2006).

Uwaga badaczy skupiła się na PAR, produkcie enzymatycznej reakcji PARS-1. Wyniki prac kilku grup badaczy udowodniły, że PAR odgrywa kluczową rolę w mechanizmie śmierci komórek w odpowiedzi na stres oksydacyjny i genotoksyczny. Wykazano, że PAR przenosi informację między jądrem a mitochondrium i wpływa na uwalnianie białka AIF (Andrabi i wsp., 2006; Yu i wsp., 2006; Bai i wsp., 2007; Moubarak i wsp., 2007).

Dodatkowo zastosowanie techniki wyciszania genów umożliwiło odnalezienie dwóch białek stanowiących potencjalne ogniwo między PARS-1 a AIF: zależnych od Ca²⁺ proteaz – kalpain (μ -kalpainy i m-kalpainy), do których aktywności wymagana jest podjednostka *capn4* oraz proapoptotyczne białko BAX (Moubarak i wsp., 2007).

Wydaje się, że kalpainy, których międzybłonowa lokalizacja mitochondrialna została niedawno potwierdzona (Heeres and Hergentrother 2007), są odpowiedzialne za „wycinanie” białka AIF z wewnętrznej błony mitochondrialnej, powodując degradację dojrzałej 67 kDa formy AIF do formy 57 kDa, odpowiedzialnej za proapoptotyczną funkcję białka. Natomiast białko BAX, wywodzące się z rodziny białek Bcl-2, aktywowane poprzez oligomeryzację, zmienia konformację zewnętrznej błony mitochondrialnej, umożliwiając uwalnianie innych białek proapoptotycznych, takich jak cytochrom c czy Smac/DIABLO.

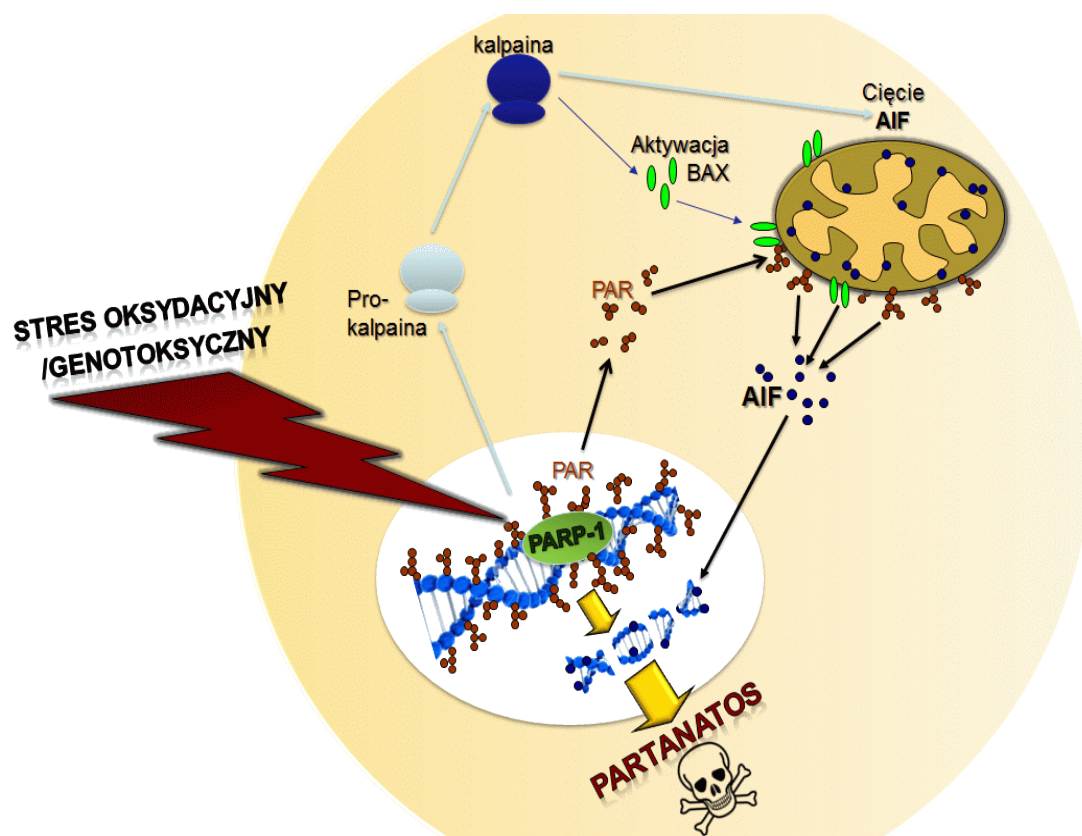
W wyniku uszkodzenia DNA w odpowiedzi na stres genotoksyczny tylko inaktywacja białka BAX (a nie innych białek proapoptotycznych z tej rodziny) hamuje proces uwalniania białka AIF, a co za tym idzie: hamuje śmierć komórki (Cheung i wsp., 2005; Moubarak i wsp., 2007). W warunkach fizjologicznych C-końcowa domena monomeru BAX jest sfałdowana i ukryta w hydrofobowej szczelinie białka, uformowanej przez trzy domeny: BH1, BH2 i BH3. W przypad-

ku sygnałów prowadzących do apoptozy C-koniec zostaje uwolniony i zakotwicza się w błonie mitochondrialnej, natomiast N-koniec zostaje wyeksponowany. Determinuje to oligomeryzację białka BAX i prowadzi do utworzenia porów dla uwalniania białek proapoptotycznych, w tym dla AIF (Danial 2007).

Najnowsze badania pokazują, że endogenny AIF w komórkach mózgu zlokalizowany jest nie tylko w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium lecz także pewna jego ilość (około 30%) znajduje się po cytozolowej stronie mitochondriów, luźno oddziałując z zewnętrzną błoną mitochondrialną (Yu i wsp., 2009). W związku z tym, wydaje się prawdopodobne, że to właśnie ta pula AIF, pod wpływem sygnału śmierci translokuje się do jądra, gdzie wpływa na kondensację i fragmentację chromatyny, w konsekwencji prowadząc do śmierci komórki określanej przez Dawsona i wsp. mianem partanatos (Wang i wsp., 2009a, b). Potwierdzeniem tej hipotezy jest fakt, że nadmierna aktywacja receptora NMDA i śmierć neuronów poprzedzona jest szybkim napływem cząsteczek AIF 62 kDa, które nie uległy uprzedniej proteolizie. Wynik ten potwierdza również niektóre dane mówiące o braku konieczności aktywacji kalpainsy w komórkach ulegających śmierci zależnej od PAR/AIF (Yu i wsp., 2002; Joshi i wsp., 2009; Wang i wsp., 2009b).

Dokładny mechanizm prowadzący do programowanej śmierci komórki partanatos nie jest do końca wyjaśniony. Wykazano na wyizolowanych jądrach, że zrekombinowany AIF inicjuje częściową, peryferyjną (typ 1) kondensację chromatyny. Najprawdopodobniej dzieje się to dzięki interakcjom białko-białko pomiędzy poszczególnymi molekułami AIF (Vahsen i wsp., 2006). Struktura krystaliczna AIF wykazuje dodatnio naładowane aminokwasy na powierzchni białka, co umożliwia wytworzenie oddziaływania elektrostatycznego z DNA. Przyłączenie AIF do DNA nie wymaga specyficznej sekwencji nukleotydów (Yu i wsp., 2002), wystarcza oddziaływanie elektrostatyczne. Badania wykazały, że AIF ma większe powinowactwo do nici pojedynczej niż podwójnej. Interakcja DNA-AIF wykazuje kooperatywność: wiele cząsteczek AIF wiąże się z kilkoma cząsteczkami DNA (ang. *clustered fashion*). Oddziaływaniu temu towarzyszy kondensacja DNA, tworzenie struktury spinki do włosów oraz oligomeryzacja DNA. Kondensacja DNA przez AIF wymaga obecności jonów Mg^{2+} i może być

aktywowana w obecności NADP^+ (Vahsen i wsp., 2006). Prawdopodobnie po translokacji AIF do jądra, białko to wiąże się z nicią DNA, powodując kondensację chromatyny. Następnie AIF wraz z innymi czynnikami, takimi jak cyklofilina A i endonukleaza G tworzy degradosom, który bierze udział w procesie fragmentacji DNA na charakterystyczne odcinki wielkości około 50 kbp (Modjtahedi i wsp., 2006), co prowadzi do apoptotycznej śmierci komórki (**rycina 4**).



Rycina 4. Model śmierci komórki na drodze zależnej od PAR/AIF

Schematyczny model śmierci komórki partanatos indukowanej wzmocnionym stresem oksydacyjnym/genotoksycznym prowadzącym do uszkodzenia DNA, hiperaktywacji białka PARP-1 i aktywacji kalpajny. W dalszej konsekwencji proces ten prowadzi do powstania polimeru PAR, który translokuje się do zewnętrznej błony mitochondrialnej, powodując jej uprzeczelnienie, a także do aktywacji proapoptotycznego białka BAX. Zmiany te wpływają na uwolnienie białka AIF z mitochondrium do jądra, gdzie dochodzi do uszkodzenia DNA, kondensacji i fragmentacji chromatyny, co prowadzi do śmierci komórki (wg Moubarak i wsp., 2007; David i wsp., 2009)

Syntaza poli(ADP-rybozy)

Syntaza poli(ADP-rybozy) typu I (PARS-1), dotychczas określana mianem polimerazy (PARP) (Hottiger i wsp., 2010), jest kluczowym enzymem jądrowym odpowiedzialnym za proces poli(ADP-rybozylacji), modyfikacji post-translacyjnej, która aktywuje wiele procesów fizjologicznych takich, jak: regulacja funkcji licznych czynników transkrypcyjnych i utrzymanie stabilności genomu (Ame i wsp., 2004; Hassa i Hottiger, 2008; Moroni i wsp., 2011; AbdElmageed i wsp., 2011). PARS-1 oraz pozostali członkowie rodziny białek PARS (**tabela 1**) charakteryzują się homologią domeny katalitycznej, bardzo konserwowanej ewolucyjnie, a różnią się specyficznością substratową.

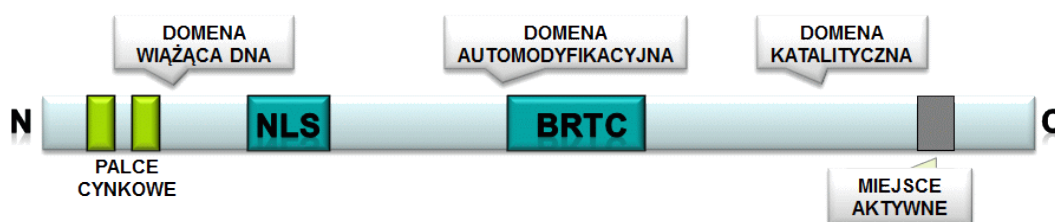
RODZINA BIAŁEK PARS	
BIAŁKA Z AKTYWNOŚCIĄ PARS	INNE
<p>PARS-1, PARS-2, VPARS (PARS-4), Tankyraza-1 (PARS-5a lub TNKS), Tankyraza-2 (PARS-5b lub TNKS2)</p>	<p>PARS-3, PARS-6, TIPARS (PARS-7), PARS-8, PARS-9, PARS-10, PARS-11, PARS-12, PARS-14, PARS-15, PARS-16</p>

Tabela 1. Rodzina białek PARS

Mimo podobnej budowy, to PARS-1 jest odpowiedzialna w ponad 90% za proces poli(ADP-rybozylacji) białek w komórkach ośrodkowego układu nerwowego (Naegeli i wsp., 1989; Strosznajder i wsp., 2005; 2010; AbdElmageed

i wsp., 2011). Katalizuje on polimeryzację białek, w której substratem jest dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy β NAD⁺. Następnie zostaje przekształcony do kwasu nikotynowego oraz ADP-rybozy, która potem łączy się kowalencyjnie z kolejną cząsteczką ADP-rybozy. W wyniku tego procesu ponad 40 docelowych białek jądrowych takich, jak: histony, polimeraz DNA 1 i 2, ligazy, topoizomerazy posiadają przyłączone rozgałęzione polimery PAR. Aktywność enzymatyczna PARS-1 może być modulowana przez proces autorybozylacji (Ueda i Hayashi, 1982).

PARS-1 jest białkiem monomerycznym, którego masa cząsteczkowa waha się w granicach 110-116 kDa, u ssaków wynosi 113 kDa. Jeśli chodzi o strukturę krystaliczną, PARS-1 zawiera trzy istotne dla swej funkcji domeny strukturalne (**rycina 5**). N-końcową domenę wiążącą DNA o masie 42 kDa, zawierającą dwa „palce cynkowe” i umożliwiającą wiązanie do pojedynczej lub podwójnej nici DNA, a także sekwencje lokalizacji jądrowej (NLS – ang. *nuclear localization sequence*). Zawiera również domenę centralną automodyfikacyjną 16 kDa, która zawiera motyw BRCT, odpowiedzialny za interakcje na poziomie białko-białko, a także 55 kDa C-końcową domenę katalityczną, przeprowadzającą proces poli(ADP-rybozyl)acji.



Rycina 5. Strukturalna i funkcjonalna organizacja cząsteczki PARS-1

Funkcjonalna rola PARS-1 oparta jest na zdolności wiązania do uszkodzonej nici DNA. Wiązanie to wpływa na bardzo szybki - nawet 500-krotny - wzrost aktywności enzymatycznej tego białka. W warunkach fizjologicznych, dzięki stałej kontroli uszkodzeń DNA i zaangażowaniu w jego naprawę, PARS-1 czuwa nad stabilnością genomu (Dantzer i wsp., 2006). Najnowsze badania

pokazują, że aktywność PARS-1 może być stymulowana nie tylko uszkodzeniem DNA, lecz także przez bezpośrednią interakcję z ufosforylowaną kinazą ERK1/2 (ang. *extracellular signal regulated kinase*). Aktywacja PARS-1 indukowana przez ERK1/2 związana jest ze wzmocnieniem sygnału przez czynnik transkrypcyjny ELK 1 i gen *c-fos*. Udział PARS-1 w tej ścieżce sygnalizacyjnej wskazuje na jego istotną rolę w różnicowaniu, wzroście i proliferacji komórek (Cohen-Armon, 2007).

Zauważyć jednak należy, że w warunkach wzmożonego stresu oksydacyjnego i genotoksycznego może dochodzić do nadmiernej aktywacji PARS-1, zużycia β NAD⁺ i ATP, co w konsekwencji prowadzi do nekrotycznej śmierci komórek.

Dla utrzymania równowagi w procesie poli(ADP-rybozyl)acji prócz aktywności PARS, bardzo ważna jest aktywność glikohydrolazy poli(ADP-rybzy) PARG. W kilka minut od powstania polimeru PAR, PARG hydrolizuje wiązania między cząsteczkami cukru, prowadząc do powstania pojedynczych cząsteczek ADP-rybozy i w ten sposób utrzymuje homeostazę PAR w komórce (Virag and Szabo 2002; Heeres and Hergenrother 2007). Najnowsze badania pokazują również, że aktywność PARG może być niezbędna dla prawidłowej naprawy uszkodzeń pojedynczej nici DNA (Fisher i wsp., 2007). PARS-1 współdziałając z PARG przyspiesza mechanizmy naprawy DNA. Dodatkowo, białko biorące udział w naprawie DNA poprzez wycinanie zasad azotowych (BER) i nukleotydów (NER) - XRCC1, jest negatywnie regulowane przez PARG. PARG zapobiega nagromadzeniu XRCC1 w miejscu uszkodzenia i dzięki temu, po ukończonej naprawie ułatwia jego odłączenie się od nici DNA (Fisher i wsp., 2007).

Lokalizacja komórkowa PARG odpowiada lokalizacji PARS-1. Oba enzymy zostały zidentyfikowane w gleju i w neuronach. Natomiast lokalizacja podkomórkowa tych enzymów jest różna i specyficzna dla różnych tkanek. W mózgu PARG jest związany z zewnętrzną błoną mitochondrialną (Poitras i wsp., 2007). Badania Whatcotta i wsp. (2009) pokazały, że pewne izofomy PARG mogą również lokalizować się w matrix mitochondrialnej. Wyniki te sugerują możliwy udział PARG w metabolizmie PAR wewnątrz mitochondriów. Wy-

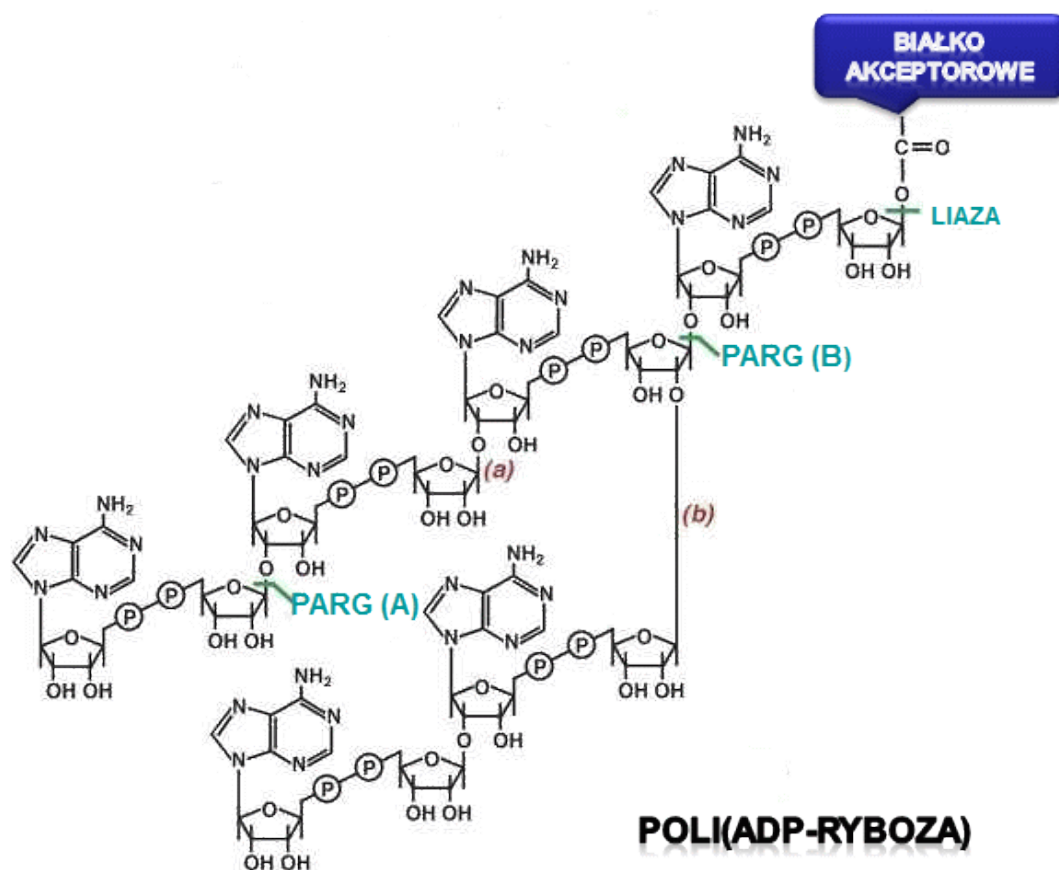
daje się, że PARG może odgrywać istotną rolę w regulacji uwalniania AIF, a także w mechanizmie przekazywania informacji pomiędzy jądrem a mitochondrium. Z jednej strony PARG może zapobiegać nadmiernemu uwalnianiu AIF w nieodpowiednim czasie, z drugiej może wpływać na jego translokację przez regulację poziomu PAR i produkcję wolnej poli(ADP-rybozy) (Whatcott i wsp., 2009).

Najwyższa aktywność PARG jest obserwowana we frakcji cytozolowej, a ostatnio stwierdzono również jej obecność w mitochondriach. Badania wykazały, że nadekspresja PARG wpływa na obniżenie zależnej od PARS-1 ekscytotoksyczności receptora NMDA (Heeres and Hergentrother 2007).

Charakterystyka cząsteczki PAR

Synteza cząsteczki PAR została odkryta przez Chambona i wsp. (1963). PAR jest rozgałęzionym polimerem powtarzających się jednostek ADP-rybozy, połączonych wiązaniem glikozydowym ryboza-ryboza (**rycina 6**).

Ze względu na swą chemiczną budowę PAR traktowany był jako trzeci typ kwasu nukleinowego, choć jego biologiczna rola jest wciąż nie do końca poznana. PAR w formie rozgałęzionej posiada długość dochodzącą aż do 200 jednostek, a w formie łańcuchowej - około 20-50 jednostek ADP-rybozy (D'Amours i wsp., 1999).



Rycina 6. Chemiczna struktura PAR

Podjednostki ADP-rybozy łączą się wiązaniem glikozydowym odpowiednio, ryboza – ryboza w sposób liniowy (a) lub tworząc rozgałęzione łańcuchy (b). Degradacja łańcucha PAR katalizowana jest przez PARG, który ma aktywność zarówno egzo-(**PARG A**), jak i endoglikozydazy (**PARG B**). Hydrolizuje ona wiązania glikozydowe pomiędzy podjednostkami PAR, prowadząc do powstania wolnej ADP-rybozy (wg Kim i wsp., 2005)

Znaczenie tej różnorodności w funkcji PAR jest nieznane, ale może ona odgrywać rolę w określaniu specyficznego funkcjonalnego działania tych związków *in vivo*.

Jak wykazały liczne badania *in vivo* oraz *in vitro*, konsekwencje łączenia się białka z długim, ujemnie naładowanym polimerem PAR są potencjalnie bardzo szerokie. Każda cząsteczka PAR zawiera rybozę, resztę adeninową oraz 2 grupy fosforanowe o ładunku ujemnym. PAR może formować struktury przez oddziaływania międzycząsteczkowe i struktury te mają możliwość niekowalen-

cyjnego oddziaływania: przyciągania lub odpychania z innymi cząsteczkami (Minaga i wsp., 1983; Mathis i wsp., 1987). Stąd też PARS-1 bezpośrednio i poprzez PAR może zmieniać aktywność białek poprzez różnorodne oddziaływanie (D'Amours i wsp., 1999).

Do funkcji PAR *in vivo* należą prawdopodobnie również specyficzne oddziaływania z różnorodnymi białkami efektorowymi. Badania proteomiczne umożliwiły zidentyfikowanie 20 aminokwasowego motywu wiążącego poli(ADP-rybozę) w różnorodnej grupie białek (histony, p53, XRCC-1 i inne) wiążących PAR (Gange i wsp., 2003). Zrozumienie tych oddziaływań ma kluczowe znaczenie dla poznania biologicznej roli PAR, w tym także regulacji aktywności niektórych czynników transkrypcyjnych. Od wielu lat znany jest udział PAR w regulacji p53. PAR tworzy kompleks z p53 i maskuje jego domenę eksportową NES (ang. *nuclear export signal*), tym samym hamując jego translokację z jądra do cytoplazmy (Węsierska-Gądek i wsp., 2003). Znaczenie PAR w mechanizmie uwalniania białka AIF zostało omówione wyżej.

Stres oksydacyjny i kompleks I mitochondriów

Ze względu na dużą zależność funkcjonowania mózgu od metabolizmu tlenowego, poziom aktywności oddechowej lokalnych mitochondriów jest znacznie wyższy niż w innych tkankach. Zwiększa to ryzyko niekontrolowanego wypływu RFT z tych organelli. RFT mogą być generowane wewnątrzkomórkowo lub też mogą powstawać w wyniku działania zewnętrznych czynników fizycznych (tj. promieniowania jonizującego czy nadfioletowego), co ma niewielkie znaczenie biologiczne.

Do powstawania RFT dochodzi w aktywowanych fagocytach, w mitochondrialnym i mikrosomalnym łańcuchu oddechowym, w trakcie autooksydacji związków endo- i egzogennych, a także w reakcjach katalizowanych przez oksydazy i przez jony metali przejściowych (Rutkowski i wsp., 2007). Na RFT składają się zarówno wolne rodniki (posiadające wolny elektron w cząsteczce tlenu), jak i formy nierodnikowe. Wolne rodniki są atomami lub cząsteczkami

zdołnymi do samoistnienia, które dzięki niesparowanemu elektronowi na powłoce walencyjnej nabierają włościwości paramagnetycznych. Do RFT w typowej komórce należą: anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, rodnik wodoronadtlenkowy, nadtlenek azotu, tlen singletowy (**tabela 2**).

	NAZWA	SYMBOL	WŁAŚCIWOŚCI
RODNIKOWE POCHODNE TLENU	ANIONORODNIK PONADTLENKOWY	$O_2^{\cdot-}$	Powstaje w wyniku jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego: $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$, głównie w wyniku wycieku elektronów z łańcucha oddechowego
	RODNIK HYDROKSYLOWY	OH^{\cdot}	Powstaje w wyniku rozpadu wiązania O-O w cząsteczce H_2O_2 pod wpływem wysokiej temperatury, promieniowania jonizującego lub w reakcjach H_2O_2 z metalami: żelazem lub miedzią (reakcja Fentona: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{3+}$), a także w reakcjach z $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 z jonami żelazowymi Fe^{3+} (reakcja Habera-Weissa: $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\cdot} + OH^-$). Jest najbardziej reaktywnym i najsilniejszym czynnikiem utleniającym
	RODNIK WODORONADTLENKOWY	HO_2^{\cdot}	Powstaje w wyniku przeniesienia protonu do atomu tlenu: $O_2^{\cdot-} + H^+ \rightarrow HO_2^{\cdot}$ lub $O_2^{\cdot-} + H_2O \rightarrow HO_2^{\cdot}$. Wraz z anionorodnikiem ponadtlenkowym w roztworze wodnym są w stanie równowagi: $O_2^{\cdot-} + H_2O \rightleftharpoons HO_2^{\cdot} + OH^-$
NIERODNIKOWE POCHODNE TLENU	NADTLENEK WODORU	H_2O_2	Powstaje w wyniku redukcji tlenu cząsteczkowego lub dysmutacji rodnika ponadtlenkowego przez dysmutazę ponadtlenkową SOD: $HO_2^{\cdot} + e^- + H^+ \rightarrow H_2O_2$. Przez katalazę jest redukowany do tlenu i wody. Odgrywa istotną rolę w procesach oksydacyjnych i może przenikać przez błony komórkowe. Jest głównym substratem reakcji wytwarzającej silnie toksyczny rodnik hydroksylowy
	TLEN SINGLETOWY	1O_2	Forma bez niesparowanych elektronów, która w przypadku O_2 jest formą wzbudzoną, o wyższej energii. Stanowi jedną z głównych toksycznych form tlenu w żywych organizmach

Tabela 2. Reaktywne formy tlenu – charakterystyka

(Rutkowski i wsp., 2007; Czapski i Strosznajder 2008)

Dodatkowo, do grupy wolnych rodników należą również tlenek azotu (NO) i jego pochodne, czyli reaktywne formy azotu - RFA (**tabela 3**).

	NAZWA	SYMBOL	WŁAŚCIWOŚCI
REAKTYWNE FORMY AZOTU	TLENEK AZOTU	NO	Jako połączenie 8-elektronowego atomu tlenu z 7-elektronowym atomem azotu ma 1 niesparowany elektron, co zalicza go do wolnych rodników. Jest słabym oksydantem. Z udziałem innych czynników może powodować lub hamować inicjację oksydacji lipidów. Dodatkowo jest inhibitorem peroksydazy glutationowej, przez co upośledza detoksyfikację H ₂ O ₂ . Jest prekursorem tworzenia silniejszych oksydantów
	NADTLENOAZOTYN	ONOO⁻	Jest głównym mediatorem cytotoksyczności NO. Powstaje w wyniku reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym: $NO + O_2^{\cdot -} \rightarrow ONOO^-$ W obecności dwutlenku węgla tworzy nitrozowęglan (ONO ₂ CO ₂ ⁻), który stymuluje nitrację i nitrozylację białek, reszt tyrozyny oraz powstanie grup karbonylowych białek, a także zmniejsza stężenie antyoksydantów w osoczu
	DWUTLENEK AZOTU	NO₂	Powstaje w wyniku reakcji NO z tlenem cząsteczkowym: $NO + O_2 \rightarrow NO_2$

Tabela 3. Główne reaktywne formy azotu – charakterystyka

(Kowalczyk i wsp., 2005; Głód i Strosznajder 2001)

Większość RFT jest niestabilna i ma krótki okres półtrwania oraz dąży do przekazania niesparowanego elektronu do najbliższej cząsteczki lub połączenia z innym wolnym elektronem. Reakcje katalizowane m.in. przez wolne rodniki są wyjątkowo ważne w procesach zachodzących w komórkach eukariotycznych. NO pełni rolę neuroprzekaźnika w ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie bierze udział w procesach rozwoju mózgu, uczenia się i pamięci oraz w regulacji

czynności ruchowych i pobierania pokarmu. W obwodowym układzie nerwowym współuczestniczy w rozkurczach mięśni gładkich przewodu pokarmowego, narządów miednicy oraz dróg oddechowych. Dodatkowo może działać jako przekaźnik międzykomórkowy regulujący napięcie naczyń krwionośnych, aktywujący płytki krwi oraz uczestniczy w kontroli odpowiedzi immunologicznej. Ochronne działanie NO przejawia się m.in. hamowaniem degranulacji komórek tucznych czy blokowaniem wytwarzania toksycznego jonu nadtlenowego. Ponadto może on regulować procesy wydzielania cytokin oraz prowadzić komórkę na drogę apoptozy lub jej zapobiegać (Kubis i Janusz, 2008).

Zaburzenie równowagi pomiędzy powstawaniem i degradacją RFT skutkuje wzrostem ich stężenia i prowadzi do stresu oksydacyjnego, który wydaje się głównym elementem patomechanizmu chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Alzheimera (AD).

Za główne źródło RFT w komórce uważane są mitochondria. Są one dynamicznymi organellami, dzięki którym zachodzi proces oddychania tlenowego, dostarczający energii pod postacią ATP i ciepła. Jednak funkcje tych organelli są znacznie szersze i dotyczą m.in.: procesów metabolizmu lipidów, aminokwasów, węglowodorów i nukleotydów, homeostazy jonowej (szczególnie Ca^{2+}), aktywnego transportu oraz ruchu komórek. Mitochondria zaangażowane są także w wewnątrzkomórkową sygnalizację apoptozy (Brągoszewki i Ostrowski 2011). Przemiany energetyczne zachodzące w mitochondriach możliwe są dzięki pracy pięciu kompleksów białkowych, które składają się na łańcuch oddechowy. Kompleks I (reduktaza dinukleotydu nikotynoadeninowego-koenzym Q – NADH-CoQ), kompleks II (reduktaza bursztynian-CoQ), kompleks III (kompleks cytochromów bc_1) i kompleks IV (oksydaza cytochromu c) prowadzą do przemian pozwalających na wytworzenie różnicy potencjałów ΔP w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Kiedy protony wracają do macierzy mitochondrialnej za pośrednictwem kompleksu V (syntazy ATP), różnica potencjałów umożliwia syntezę ATP (Genova i wsp., 2005).

W łańcuchu oddechowym to kompleks I uważany jest za główne fizjologiczne miejsce produkcji większości RFT (Andreyev i wsp., 2005; Brookes 2005; Chinta i wsp., 2009). Jest on dużym (u ssaków około 980 kDa), wielopodjed-

nostkowym kompleksem enzymów, zbudowanym z 45 podjednostek. 38 podjednostek z prefiksem NDU (ang. *NADH-dehydrogenase-ubiquinone*) kodowanych jest przez genom jądrowy, natomiast pozostałe 7 z prefiksem ND (ang. *NADH-dehydrogenase*) przez mitochondrialne (mt) DNA.

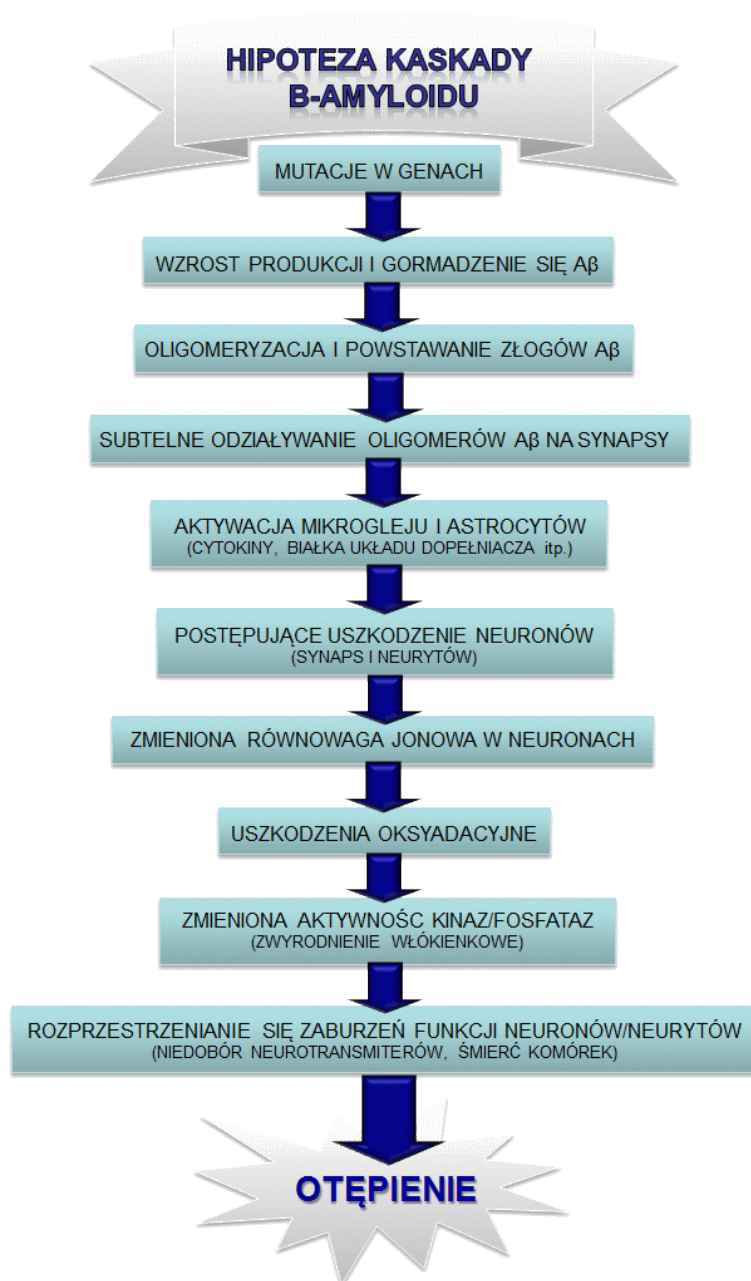
Badania z użyciem mikroskopii elektronowej na oczyszczonym kompleksie I wykazały L-kształtną strukturę kompleksu, składającą się z ramienia hydrofobowego i z ramienia obwodowego, które wystaje do macierzy mitochondrialnej (Calson i wsp., 2009; McKenzie i Ryan, 2010). Mimo wielu badań prowadzonych w ostatnich latach, nie udało się określić, jaką pozycję zajmuje każda z podjednostek w strukturze ludzkiego kompleksu I. Wiadomo jednak, że na kompleks składają się cztery podkompleksy (I α , I β , I λ , I γ). Dodatkowo dla właściwej organizacji białek w podjednostkach kompleksu niezbędne są czynniki wiążące. Jednym z nich, jak już wcześniej zostało opisane, wydaje się AIF.

Badania prowadzone na myszach Hq, u których poziom AIF jest obniżony, wykazały dysfunkcje mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Największe defekty obserwowane były w poziomie i aktywności kompleksu I u tych zwierząt. Opisane zostały także przypadki niewłaściwego funkcjonowania kompleksu III i IV, jednak zmiany te były specyficzne dla pewnych komórek i tkanek (Jozza i wsp., 2005, Vashen i wsp., 2004). Dodatkowo w badaniach Vashena i wsp. (2004) pokazano, że obniżenie ilości podjednostek kompleksu I jest regulowane posttranslacyjnie, a nie przez poziom ekspresji genów. Niewyjaśnione pozostaje jednak, czy AIF pełni funkcję czynnika wiążącego, czy raczej jest niezbędny dla właściwego utrzymania stabilności kompleksu I (Modjtahedi i wsp., 2006; Hangen i wsp., 2009). Molekularny mechanizm regulacji funkcji kompleksu I przez AIF i tkankowa/komórkowa specyficzność jego działania wymagają dalszych wyjaśnień.

Toksyczność peptydów amyloidu beta i choroba Alzheimera

Choroba Alzheimera (AD) należy do schorzeń otępiennych (50% wszystkich przypadków otępienia), charakteryzujących się zaburzeniami czynności

poznawczych, zanikiem pamięci, wytracaniem zdolności do myślenia abstrakcyjnego oraz do wykonywania w sposób logicznie uporządkowany złożonych, a w miarę postępu choroby, nawet prostych zadań. W celu powiązania wielu różnych obserwacji w jeden model, z badań nad etiologią choroby Alzheimera została zaproponowana przez Dennisa Selkoe i Johna Hardy'ego hipoteza kaskady β -amyloidu (Selkoe 1991, 1996; Hardy i Higgins 1992) (**rycina 7**).



Rycina 7. Sekwencja wydarzeń prowadząca do neurodegeneracji w chorobie Alzheimera

Przedstawiona hipoteza zakłada, że w rozwoju choroby najważniejszym elementem są zaburzenia metabolizmu białka prekursorowego amyloidu β (APP), których bezpośrednim efektem jest produkcja β -amyloidu ($A\beta$). W przebiegu choroby stwierdza się zmiany w mózgu polegające na powstawaniu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej blaszek złożonych z $A\beta$ i licznych białek towarzyszących, a także wewnątrzkomórkowych splotów neurofibrylarnych, będących wyrazem hiperfosforylacji białka tau. Złogi $A\beta$ odkładają się w hipokampie i w korze mózgu, a także w naczyniach mózgowych. W tych częściach mózgu dochodzi do zmniejszenia liczby neuronów i synaps. Obserwowane są degeneracja i obumieranie neuronów oraz zwiększona aktywność mikrogleju.

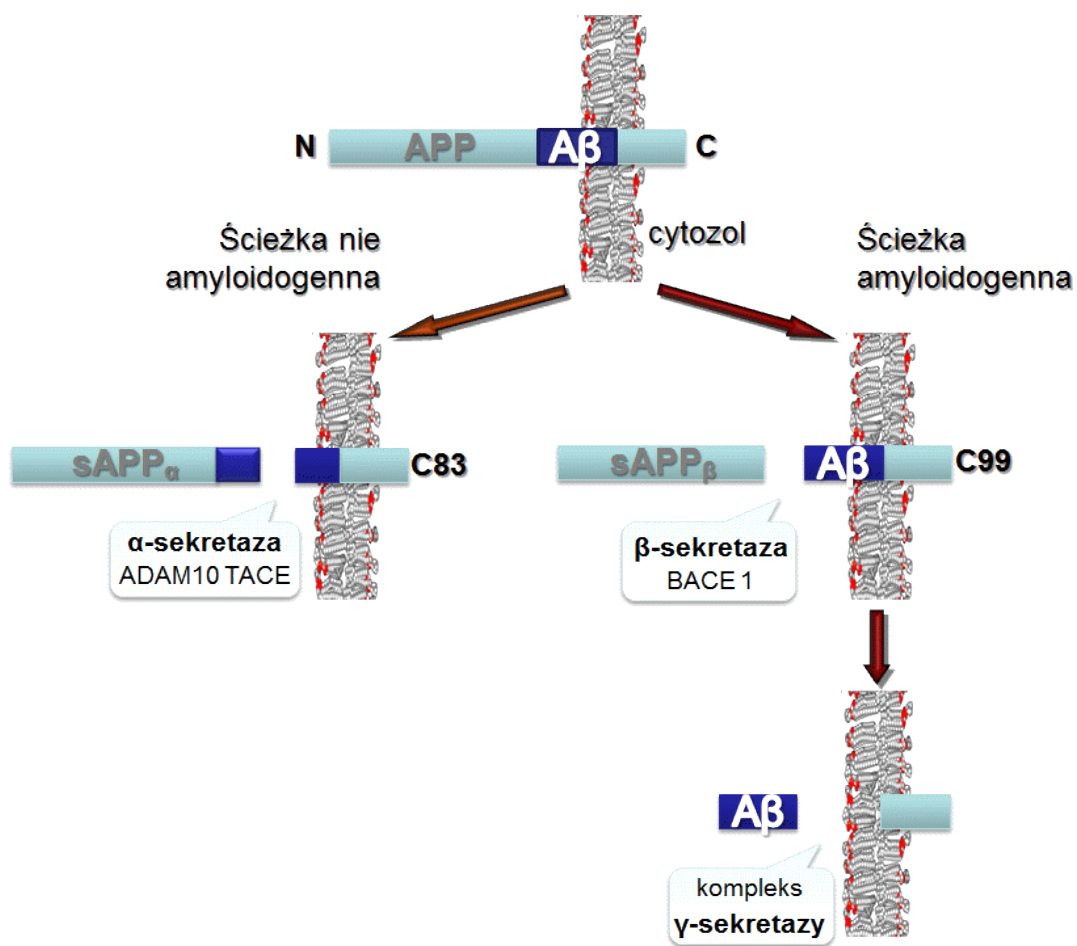
W ostatnich dziesięcioleciach neurotoksyczne działanie $A\beta$ jest bardzo intensywnie badane, jednak wiele zagadnień pozostaje wciąż niewyjaśnionych. Badania wskazują na istotne znaczenie aktywacji stresu oksydacyjnego spowodowanego nadmierną produkcją wolnych rodników, zaburzeniem homeostazy wapnia, fosforylacją i defosforylacją białek oraz rozwojem odpowiedzi zapalnej. Ostatnie wyniki badań zwracają uwagę na wewnątrzkomórkowe działanie oligomerów $A\beta$, na ich znaczenie w zaburzeniu funkcji mitochondriów.

Badania wykazały obecność białka prekursorowego amyloidu (ang. *β -amyloid precursor protein, APP*) w mitochondriach (Devi i wsp., 2006). Funkcja APP nie jest dokładnie poznana, jednak wiadomo, że jest on zaangażowany w rozwój synaps i plastyczność neuronów (Priller i wsp., 2006; Turner i wsp., 2003). APP jest integralnym białkiem błonowym, zlokalizowanym na dłuższym ramieniu chromosomu 21. W jego budowie można wyróżnić 3 domeny: dużą, zewnątrzkomórkową domenę sygnałową, domenę transbłonową oraz stosunkowo krótką, cytozolową domenę C-końcową. APP podlega rozlicznym modyfikacjom posttranslacyjnym takim, jak glikozylacja, fosforylacja, czy proteoliza prowadząca do powstania fragmentów białkowych o różnej długości i funkcji.

Gen dla białka APP zawiera 18 eksonów i posiada kilka izoform. W mózgu najczęściej występują APP-695, APP-751, APP-770, których przeciętna długość to 695-770 aminokwasów. Ponadto znanych jest 8 różnych form splicingowych tego genu. APP obecne jest w licznych komórkach, ale w neuronach jego zawartość jest stosunkowo wysoka. Ekspresja izoform APP-695 jest charaktery-

styczna dla komórek nerwowych (Sisodia i wsp., 1993; Zhang i wsp., 2011), a mutacje tego genu są sciřle związane z patogenezą AD.

Uwalnianie A β z białka prekursorowego polega na dwóch następujących po sobie cięciach proteolitycznych przez β i γ -sekretażę. β -sekretaza (BACE1) jest proteaz aspartylow (Vassar i wsp., 1999) i dokonuje cięcia APP od strony zewnątrzkomórkowej, generując rozpuszczalny fragment N-końcowy zwany sAPP β oraz 99 aminokwasowy, C-końcowy fragment zwany C99. W dalszej kolejnořci w obrębie sekwencji transbłonowej dochodzi do kolejnego proteolitycznego cięcia przez γ -sekretażę, która jest kompleksem białkowym złoŹonym z presyniliny 1 (PS1) lub preseniliny 2 (PS2), nikastryny, PEN2 (ang. *presenilin enhancer 2 homolog*) i APH-1 (ang. *anterior pharynx defective 1 homolog A*) (Wolfe i wsp., 1999). W wyniku tego cięcia powstaje 37-43 aminokwasowy peptyd A β (Kang i wsp., 1987). APP moŹe być takŹe metabolizowane w sposób nie-amyloidogeny przez α -sekretażę, która tnie APP wewnątrz sekwencji A β (**rycina 8**).



Rycina 8. Proteolityczna obróbka APP

Białko prekursorowe (APP) jest kolejno cięte przez β-sekretazę i γ-sekretazę. Powoduje to tworzenie rozpuszczalnego białka prekursorowego amyloidu (sAPPβ) i fragmentu białka amyloidu β 42 (Aβ 1-42). Agregaty fragmentów Aβ 1-42 formują pozakomórkowe płytki charakterystyczne dla choroby Alzheimerera (wg LaFerla i wsp., 2007; Zhang i wsp., 2011)

Metabolizm APP przez wszystkie trzy sekretazy i produkcja Aβ są zjawiskiem fizjologicznym, a Aβ jest obecny zarówno w płynie mózgowo-rdzeniowym, jak i w osoczu zdrowych osób w ciągu całego życia (Seubert i wsp., 1992, Zhang i wsp., 2011).

Wydaje się, że kluczowa rola Aβ w patogenezie choroby Alzheimerera jest związana z faktem, że zwiększona produkcja Aβ, a szczególnie Aβ₍₁₋₄₂₎, spowodowana mutacją w genie dla *APP* lub *PS1* i *PS2* powoduje wystąpienie szybko

postępującej, dziedzicznej choroby Alzheimera (Murrell i wsp., 1991, Levy-Lahad i wsp., 1995).

Dotychczas opisano około 26 mutacji dla genu APP, przy czym tylko część z nich odpowiada za rozwój rodzinnej formy tej choroby. Do najlepiej opisanych mutacji punktowych można zaliczyć dwie: mutację szwedzką – APPsw oraz mutację londyńską – APPlon (rycina 9).



Rycina 9. Charakterystyka mutacji londyńskiej i szwedzkiej ludzkiego genu APP
(wg Saftig i wsp., 1996)

Mutacja szwedzka (KM670/671NL) powoduje nasilone cięcie APP przez β -sekretazę i prowadzi do zwiększonej produkcji peptydów A β (Sinha i Lieberburg, 1999). Mutacja londyńska (V717I) prowadzi do przesunięcia proporcji cięcia przez γ -sekretazę w kierunku zwiększenia uwalniania A β 1-42 w stosunku do A β 1-40 (Goate i wsp., 1991; Saftig i wsp., 1996; Sinha i Lieberburg, 1999).

W przestrzeni zewnątrzkomórkowej peptydy A β mogą agregować tworząc oligomery, a w dalszej kolejności nierozpuszczalne fibryle, które są składnikiem blaszek starczych (Kayed i wsp 2003). Stwierdzono, że zdolność do agregacji zależy od długości uwalnianego peptydu. Peptydy A β 1-42 są silniej

hydrofobowe i łatwiej agregują, stąd ich większa neurotoksycznořć (Jarrett i wsp., 1993).

A β 1-42 łatwo przyjmuje strukturę β -harmonijki. Taka konformacja powoduje jego nierozpuszczalnořć i odpornořć na działanie proteaz. Najnowsze badania wskazują na istotne znaczenie oligomerów nagromadzających si wewnątrzkomórkowo w patogenezie choroby Alzheimera (Westerman i wsp., 2002; Kim i wsp., 2002, 2005; Lesne i wsp., 2006). Okazało się, że oligomery A β mogą powodować dysfunkcj mitochondriów, prowadząc do degeneracji, śmierci neuronów oraz zaburzenia pamieci (Lambert i wsp., 1998; Lesne i wsp., 2006), a poziom rozpuszczalnych oligomerów A β koreluje ze stopniem zaburzeń poznawczych u cierpiących na chorob Alzheimera (McLean i wsp., 1999, Lesne i wsp., 2006).

To włsnie oligomery, a nie monomery lub agregaty A β , zaburzają plastycznosć synaptyczną mózgu (Walsh i wsp., 2002) i powodują upořledzenie pamieci (Lesne i wsp., 2006) oraz ubytek synaps (Shankar i wsp. 2007), przy czym największą toksycznosć przypisuje się trimerom A β (Townsend i wsp., 2006). Badania prowadzone na zwierzętach transgenicznych pokazały, że nasilone tworzenia blaszek amyloidowych z równoczesnym obniżeniem ilořci oligomerów wpływają na zmniejszenie zaburzeń behawioralnych u tych zwierząt (Cheng i wsp., 2007).

Udział peptydów A β w zaburzeniu funkcji mitochondriów

Mitochondria to głównie źródo wolnych rodników powstających w procesie oddychania. Uszkodzenia mitochondriów są jednym z pierwszych sygnałów pojawiających się wczeřniej niź zwyrodnienia włókienkowe, wskazujących na patologię choroby Alzheimera (Hirai i wsp., 2001; Leuner i wsp., 2007).

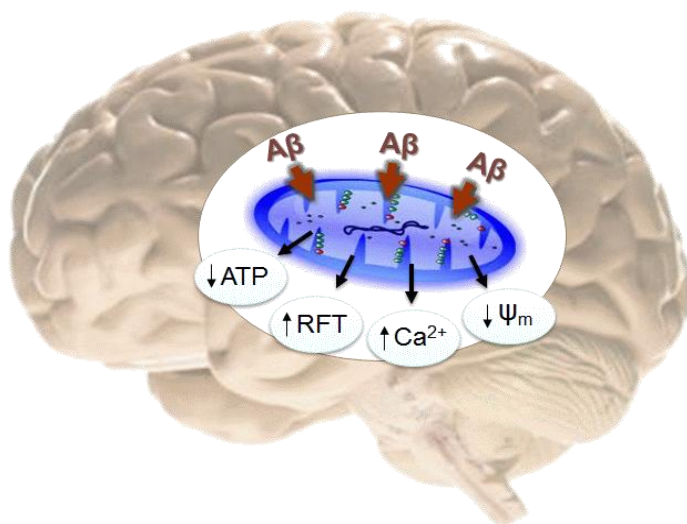
Badania ostatnich lat pokazują, że peptydy A β uwalniane są wewnątrzkomórkowo i mogą bezpořrednio oddziaływać na mitochondria lokalizując się

w nich, a także prowadząc bezpośrednio do ich uszkodzenia (Anandatheertharade i wsp., 2003). A β może zaburzać funkcje łańcucha oddechowego, a w konsekwencji prowadzi do aktywacji uwalniania wolnych rodników (Sheehan i wsp., 1997).

Prowadzone na szeroką skalę badania działania peptydów A β na wyizolowane mitochondria pokazały szeroki wachlarz zmian zachodzących w tych organellach. Pod wpływem A β dochodziło do:

- zaburzeń aktywności kluczowych enzymów mitochondrialnych,
- uszkodzeń łańcucha oddechowego,
- depolaryzacji, a także uprzepuszczelnienia błony mitochondrialnej, co powodowało wypływ białek proapoptotycznych, kryzys energetyczny i śmierć komórki (Parks i wsp., 2001; Kim i wsp., 2002; Moreira i wsp., 2002; Abramov i wsp. 2004; Leuner i wsp., 2007).

A β obecny wewnątrzkomórkowo znacząco obniża aktywność oksydazy cytochromowej, ale także dehydrogenazy α -ketoglutaranowej i dehydrogenazy pirogronianowej (Casley i wsp., 2002). Dlatego też uważa się, że wewnątrzkomórkowy A β bezpośrednio wpływa na uszkodzenie funkcji mitochondriów i bezpośrednio prowadzi do deficytu energetycznego obserwowanego w AD (**rycina 10**).



Rycina 10. Wpływ peptydów A β na funkcję mitochondriów

Peptydy A β wpływają na: obniżenie produkcji ATP i potencjału błonowego, a także wzrost produkcji wolnych rodników i zaburzenie homeostazy Ca $^{2+}$

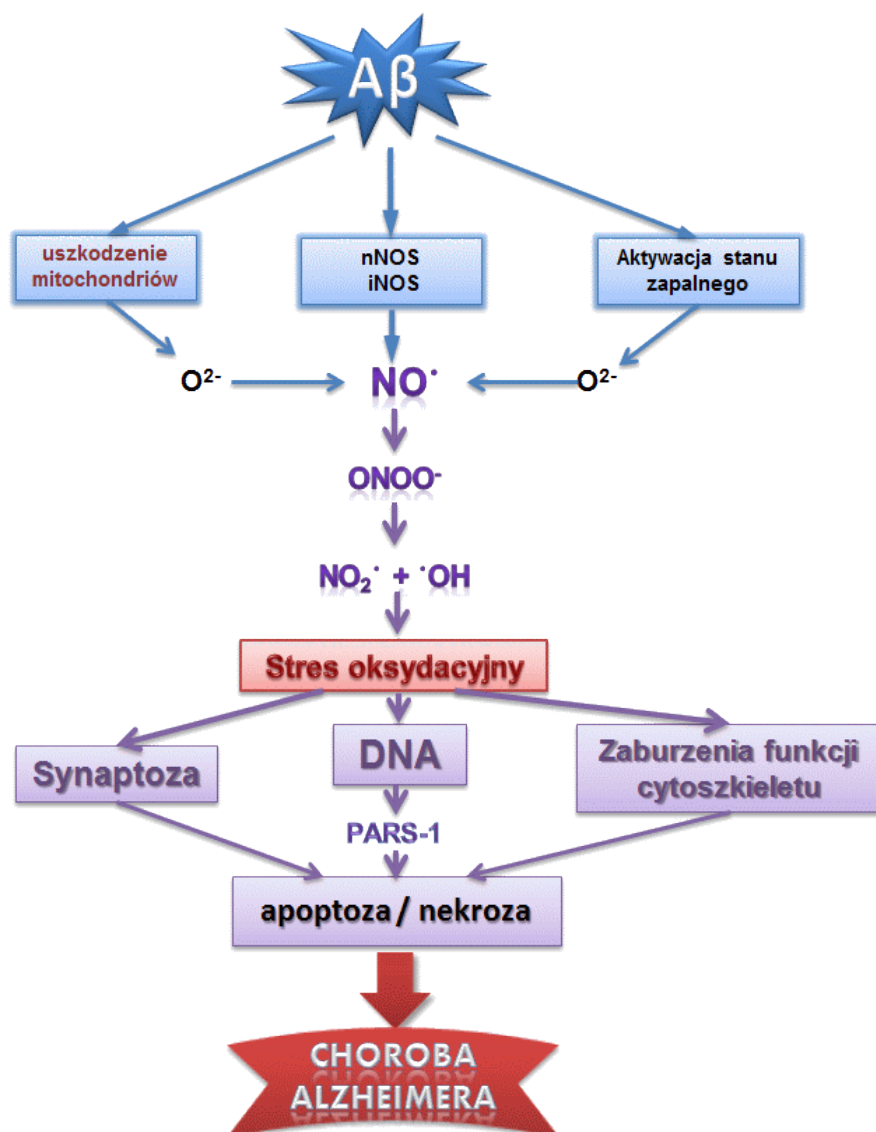
Teoria wolnorodnikowa w toksyczności peptydów A β

Jedną z nieustannie badanych teorii toksyczności peptydów A β jest teoria wolnorodnikowa (Stadtman i Levine 1999; Gipson i wsp., 2004; Matsumoto i wsp., 2006). Badania prowadzone na mózgach osób chorych na chorobę Alzheimera wskazują na znaczący wzrost uszkodzeń wolnorodnikowych (Markesbery 1997).

Uważa się, że A β może powodować wytwarzanie wolnych rodników tlenowych, chociaż mechanizm tego procesu pozostaje nadal w pełni niewyjaśniony. Agregacja A β odkładanego w postaci płytek starczych jest inicjowana oksydacją peptydów A β , zależną od metali przejściowych (Dyrks i wsp., 1992). Badania wykazują, że uwalniane przez A β wolne rodniki stymulują oligomeryzację i fibrylizację peptydów A β i tym samym zwiększają ich toksyczność (Mattson i Goodman, 1995). Dodatkowo, okazało się, że A β może produkować nadtlenek wodoru (H $_2$ O $_2$) w wyniku redukcji metali przejściowych. Prowadzi to,

w reakcji Fentona, do uwalniania bardzo reaktywnego rodnika hydroksylowego, który następnie uszkadza białka, lipidy i DNA (Huang i wsp., 1999). Uwalniany w nadmiernej ilości A β może bezpośrednio wchodzić w interakcję z błonami komórkowymi (Murray i wsp., 2007) lub też oddziaływać z jonami żelaza grup hemowych różnych enzymów (w tym enzymów łańcucha oddechowego), prowadząc do zwiększenia produkcji reaktywnych form tlenu (Atamna i wsp., 2006). Wolnorodnikowe uszkodzenie lipidów błon komórkowych prowadzi do utraty integralności błony, zaburzenia homeostazy i uszkodzenia komórki, a także do zmian konformacji i funkcji wielu białek (Czapski i Strosznajder, 2008).

Aktywacja mikrogleju w odpowiedzi na gromadzenie się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej peptydów A β wywołuje stan zapalny, co również prowadzi do wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu. Model toksyczności A β zaproponowany przez Buterfielda zakłada kluczowe znaczenie stresu oksydacyjnego w tym procesie (**rycina 11**) (Buterfield i wsp., 2003).



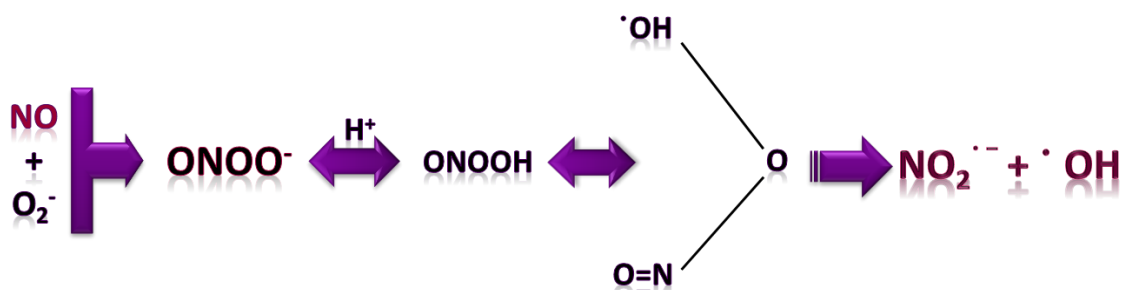
Rycina 11. Model stresu oksydacyjnego wywołanego peptydami A β

Liczne dane literaturowe wskazują na udział NO w neurotoksyczności peptydów A β (Strosznajder i wsp., 2000, Keil i wsp., 2004; Chalimoniuk i wsp., 2007).

Badania prowadzone na myszach transgenicznych dowiodły, że w mózgu zwierząt z amyloidozą i zmutowaną postacią preseniliny 1, obserwuje się czterokrotnie większą aktywność indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) (Eikelenboom i wsp. 2006). Toksyczne działanie A β przejawia się zdolnością do aktywowania czynnika transkrypcyjnego NF- κ B nadzorującego ekspresję iNOS i wytwarzanie NO. Stężenie iNOS wzrasta w mózgu w odpowiedzi na stan zapal-

ny będący następstwem powstawania złogów amyloidowych (Craft i wsp., 2006). Hiperaktywacja iNOS i uwalnianie dużych ilości NO prowadzi do nieodwracalnego zaburzenia funkcji komórek: jest cytotoksyczne i przez aktywację procesów wolnorodnikowych może dodatkowo wpływać na zmianę funkcji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (Markesbery i Carney, 1999; Medeiros i wsp., 2007). Dodatkowo NO może wpływać na aktywację ADP-rybozylacji białek przez aktywację PARS-1 oraz brać udział w S-nitrozylacji białek, powodując modulację aktywności enzymów i receptorów (w tym receptora MNND) (Brune i wsp., 1994; Nakamura i Lipton, 2010, 2011a, 2011b). NO może również zaburzać fosforylację oksydacyjną przez hamowanie kompleksu I i II łańcucha oddechowego (Bolanos i wsp., 1997, 1998).

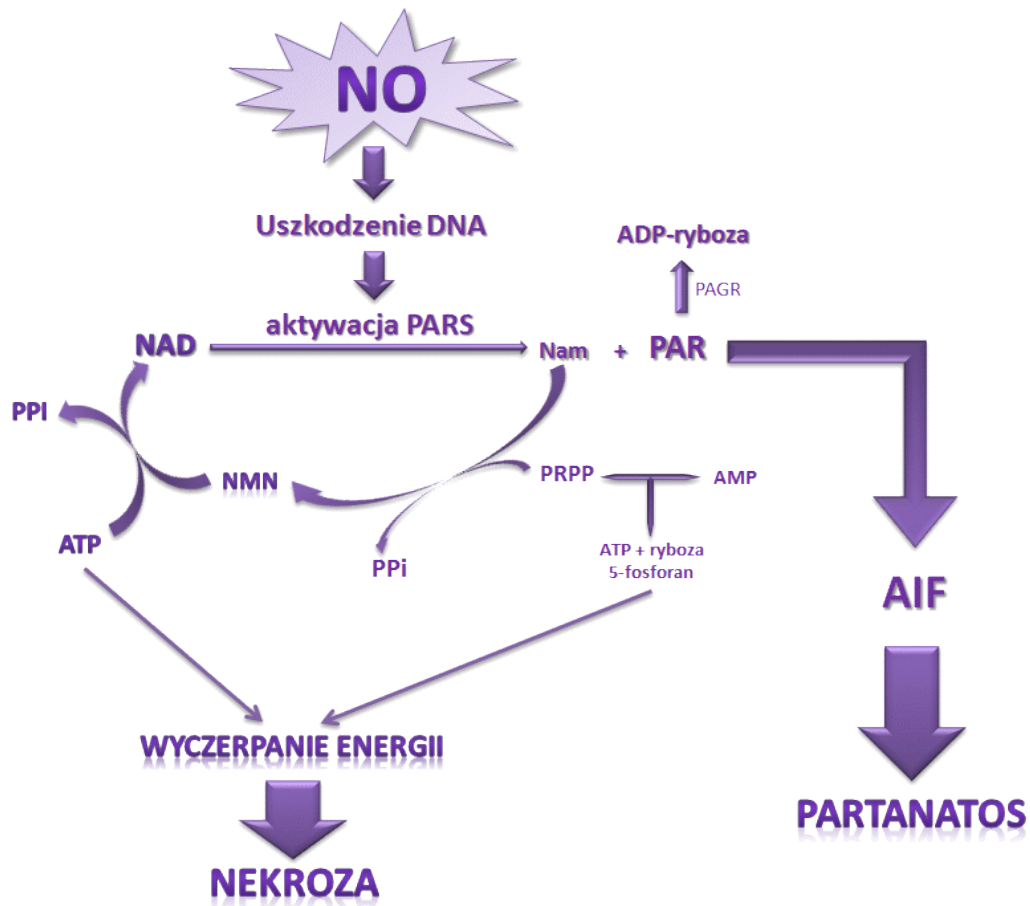
Prawdopodobnie NO, charakteryzujący się niską reaktywnością, w obecności anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) bardzo szybko prowadzi do wytworzenia nadtlenoazotynu ($ONOO^-$) (Koppenol i wsp., 1992). Nadtlenoazotyn jest bardzo silnym utleniaczem i może modyfikować białka, lipidy oraz kwasy nukleinowe (Kilbourn i wsp., 2000). W dalszej konsekwencji przemian jego rozpad prowadzi do powstania rodnika dwutlenku azotu (NO_2^{\cdot}) i bardzo reaktywnego rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$) (Lipton i wsp., 1993; Strosznajder i Chalimoniuk, 2001) (**Rycina 12**).



Rycina 12. Powstawanie i rozpad kwasu nadtlenoazotawego

Silnie reaktywny rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) powstały w wyniku rozpadu kwasu nadtlenoazotawego

Nadmiernie uwalniany NO, podobnie jak inne wolne rodniki, bierze udział w wolnorodnikowym uszkodzeniu DNA, które prowadzi do powstania licznych uszkodzeń pojedynczych zasad azotowych, pęknięć nici DNA oraz tworzenia adduktów (Cadet i wsp., 2003), co prowadzi do śmierci komórki (rycina 13).



Rycina 13. Neurotoksyczne działanie NO

Ze składnikami kwasów nukleinowych bezpośrednio może oddziaływać rodnik hydroksylowy i to on jest odpowiedzialny za większość uszkodzeń, szczególnie zasad pirymidynowych. Bierze on również udział w inaktywacji genów supresorowych oraz aktywacji onkogenów. Wśród istotnych wskaźników

oksydacyjnego uszkodzenia DNA naleŹy wyróżnić 8-oksyguaninę (8-oksyaGua), której powstanie ma działanie mutagenne i kancerogenne.

Znaczna liczba związków kancerogennych, genotoksycznych jest stale wykrywana w otaczającym nas řrodowisku, a uniknięcie z nimi kontaktu jest włařciwie niemoŹliwe. Głównymi Źródłami substancji genotoksycznych, które w większości stanowią związki alkilujące, są przede wszystkim: produkty uboczne procesów przemysłowych i składowe dymu papierosowego. Substancje te są szeroko rozpowszechnione w powietrzu, glebie, wodzie, a także żywności. Mogą stanowić kontaminanty lub teŹ powstają ze związków naturalnie występujących w żywności podczas jej przetwarzania (Więckiewicz i wsp., 2006). Związki genotoksyczne, mimo Źe są bardzo reaktywne i nie działają selektywnie, są równieŹ stosowane w terapii. Do tego typu związków naleŹą m.in. niektóre antybiotyki, leki psychotropowe, immunosupresanty oraz cytotatyki takie, jak: cyklofosfamid, mechloretamina czy mitomycyna c (Patric, 2001).

Do związków genotoksycznych występujących w řrodowisku alkilujących DNA naleŹą m.in.: siarczan metylu, metylonitrozomocznik (MNU), dimetylonitrozoamina, N-metyl-N-nitro-N-nitrozoguanidyna (MNNG), sulfonian etylowy (MMS) oraz diepoksybutan. Obecnořć grup metylowych, etylowych i innych w tych związkach powoduje alkilację zasad azotowych. Najwięszą wraŹliwořć na alkilację w α -helisie wykazuje atom azotu (N7) guaniny, a w dalszej kolejnořci atomy azotu guaniny (N1), adeniny (N1 i N3) i cytozyny (N3). Atom azotu ma zdolnořć eliminowania jonu chlorkowego w wyniku wewnątrcząsteczkowej reakcji podstawienia, z utworzeniem silnie elektrofilowego jonu azyrydyniowego, co umoŹliwia reakcję alkilowania. W związku z tym, Źe proces moŹe się powtarzać, dochodzi do tworzenia wiązania krzyŹowego międy łańcuchami. Pod wpływem tych związków obserwuje się liczne tranzycje i transwersje zasad typu: AT→TA, AT→GC, GC→CG, GC→AT, GC→TA.

Badania dotyczące genotoksycznořci są szeroko rozpowszechnione, a molekularne działanie związków genotoksycznych i zmiany przez nie powodowane, szczególnie w komórkach nerwowych, pozostają wciąŹ nie w pełni wyjařnione. Sprawę utrudnia fakt, Źe różnego typu oddziaływania obserwowane są

w zależności od rodzaju komórek i natężenia stresora. Badania prowadzone w warunkach stresu genotoksycznego powodującego masywne uszkodzenia DNA, wykazały, że zmiany te mogą prowadzić do nadmiernej aktywacji PARS-1, zużycia β NAD⁺ i ATP, w konsekwencji do nekrotycznej śmierci komórki (Hegedűs i wsp., 2008) lub jak wykazują badania Wanga i wsp. (2009) od zależnej od AIF/PAR śmierci apoptotycznej niezależnej od kaspaz. Natomiast doświadczenia prowadzone przez Houra i wsp. (1999) na hodowli komórek NIH3T3 wykazały, że alkilacja DNA doprowadza do aktywacji kaspaz i do degradacji PARS-1, a także do uwalniania cytochromu c i do apoptotycznej śmierci komórki zależnej od kaspaz. Do tej pory tylko nieliczne badania prowadzone były na komórkach neuronalnych.

Mechanizm śmierci komórki zależnej od AIF pozostaje nadal niejasny, a dokładne poznanie udziału AIF i PAR w warunkach stresu genotoksycznego winno być pomocne w opracowaniu strategii zapobiegającej obumieraniu komórek nerwowych, co może opóźnić lub zahamować postęp takich schorzeń, jak niedokrwienie, choroba Parkinsona czy Alzheimerera.

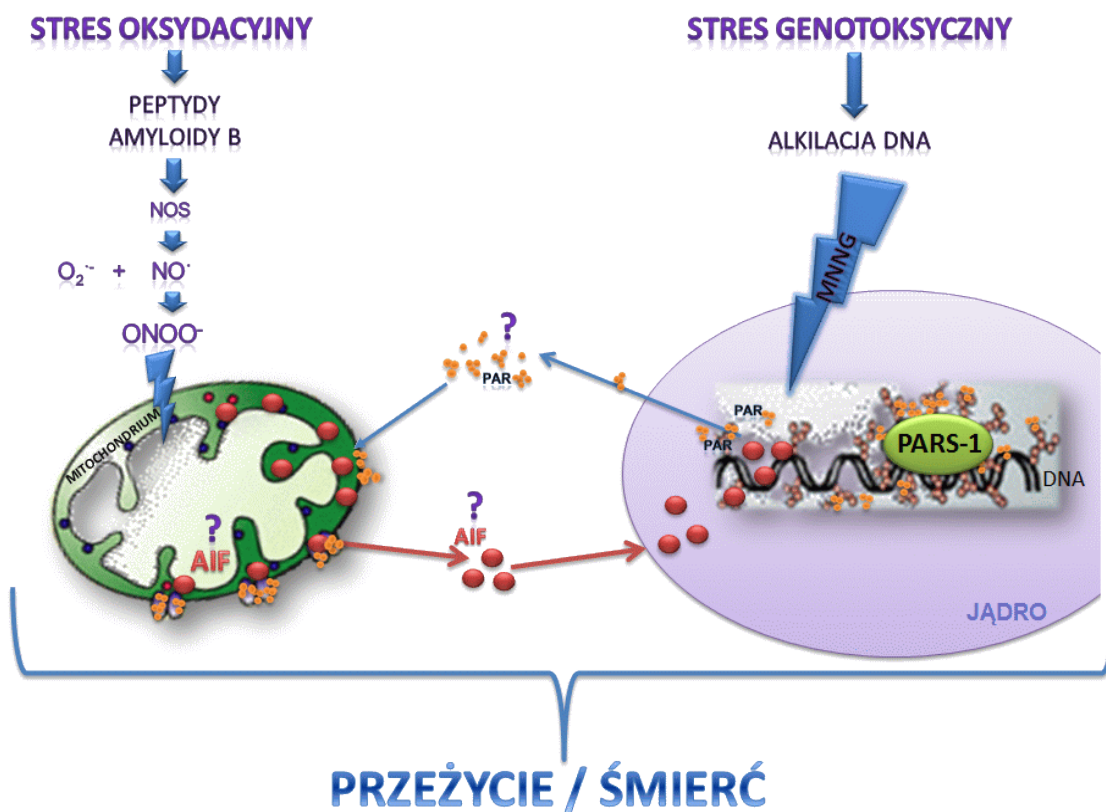
Cel

Celem pracy było: **zbadanie ekspresji genu, poziomu białka i udziału czynnika indukującego apoptozę AIF w procesach przeżycia i śmierci komórek w warunkach działania peptydów amyloidu β , stresu oksydacyjnego/nitrozacyjnego oraz genotoksycznego. Ponadto zbadanie zależności pomiędzy poziomem AIF w mitochondriach a aktywnością PARS-1/poziomem PAR i przeżywalnością komórek.**

Cel został zrealizowany przez wykonanie następujących zadań szczegółowych:

- Zbadanie poziomu i lokalizacji białka AIF w komórkach PC12, transfekowanych ludzkim genem APP typu dzikiego (APPwt) oraz z mutacją szwedzką (APPsw), charakteryzujących się różnym poziomem sekrecji peptydów A β , a także poddanych działaniu egzogennych peptydów A β 1-42. Porównanie uzyskanych wyników *in vitro* z badaniami w zwierzęcym modelu choroby Alzheimera, myszach transgenicznym APP^{+/+}.
- Określenie poziomu i aktywności PARS-1 we frakcji jądrowej trzech typów komórek PC12, charakteryzujących się różnym poziomem sekrecji peptydów A β .
- Zbadanie i porównanie wpływu stresu nitrozacyjnego wywołanego donorem tlenu azotu nitroprusydku sodu (SNP) na poziom białka AIF, poziom i aktywność PARS oraz przeżywalność komórek PC12.

- Zbadanie znaczenia AIF i PAR w obumieraniu neuronów hipokampa, komórek HT22 w odpowiedzi na stres genotoksyczny wywołany działaniem czynnika alkilującego DNA, MNNG. Ocena działania inhibitorów PARS-1 i innych wyselekcjonowanych związków protekcyjnych na poziom AIF w mitochondriach i przeżywalność komórek.



Rycina 14. Cel pracy

Stres oksydacyjny i genotoksyczny wpływają na uszkodzenie mitochondriów i nici DNA. Celem niniejszej pracy było stwierdzenie udziału AIF/PARS/PAR w procesie przeżycia i śmierci komórek w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego toksycznością peptydów A β i genotoksycznego wywołanego alkilacją DNA

Materiały i metody

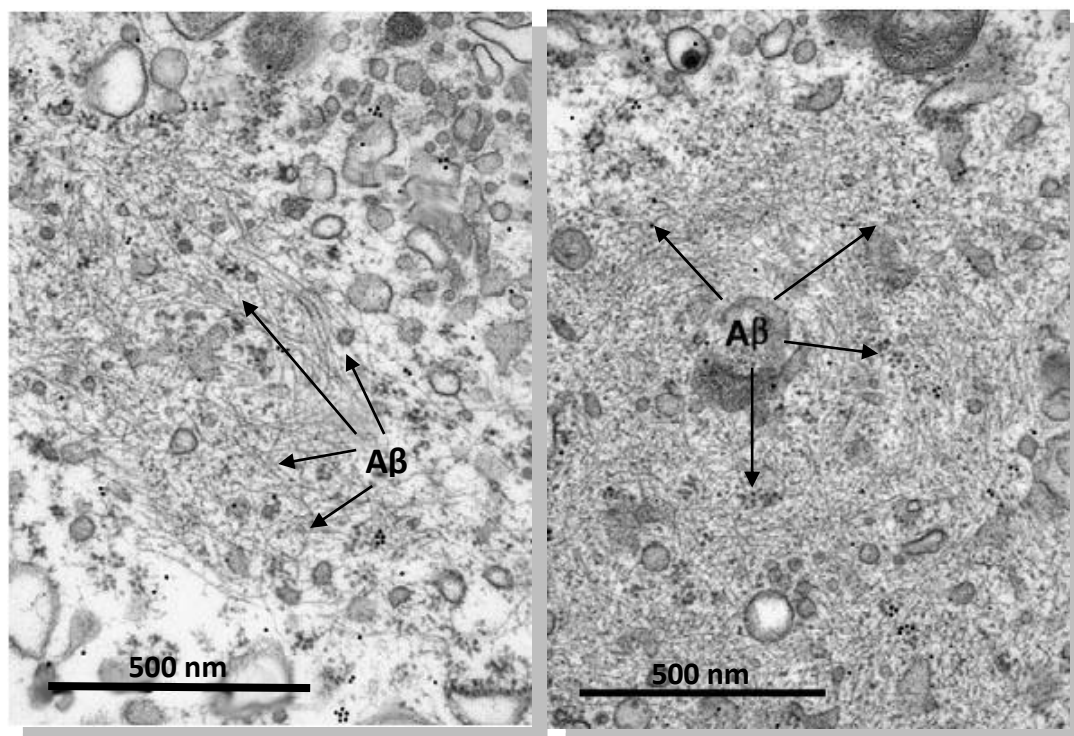
Komórkowe modele badawcze

Linia szczurzych komórek pheochromocytoza – PC12

Badania *in vitro* prowadzono na hodowli szczurzych komórek pheochromocytoza (z chromochłonnego guza rdzenia nadnerczy - PC12). Komórki PC12 pochodzą z Zakładu Farmakologii Biocentrum Uniwersytetu we Frankfurcie i są stabilnie transfekowane ludzkim genem białka prekursorowego amyloidu β (APP) dzikiego typu (APPwt) lub z mutacją typu szwedzkiego (APPsw, 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 produkcji A β , którego poziom jest 2-krotnie podwyższony w komórkach APPwt i około 3,6-krotnie w komórkach APPsw w porównaniu do komórek kontrolnych. Komórki te charakteryzuje również wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu A β (**rycina 15**).

Komórki APPwt, APPsw i kontrolne hodowane były w standardowej pożywce DMEM (Eagle'a) (Sigma) z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (FCS) i 5% surowicy końskiej (HS) inaktywowanych w 65 °C, zawierającej 2 mM glutaminę i antybiotyki (50 jednostek/ml penicyliny, 50 μ g/ml streptomycyny i 400 μ g/ml G418) w 37°C, w atmosferze 5% CO₂ i dużej wilgotności. Badania prowadzone były na konfluentnych pasażach od 4 do 16. Do doświadczeń komórki wysiewano z gęstością 1-1,5 x 10⁶ komórek na szalkę o średnicy 10 cm, 0,5 x 10⁶ komórek na szalkę o średnicy 3,5 cm lub 1 x 10⁵ komórek do dołka na płytkach 24-dołkowych. Komórkom używanym do eksperymentów zmieniano-

pożywkę na DMEM zawierającą 2% FCS oraz 2 mM glutaminę i antybiotyki w stężeniach takich, jak podano wyżej.



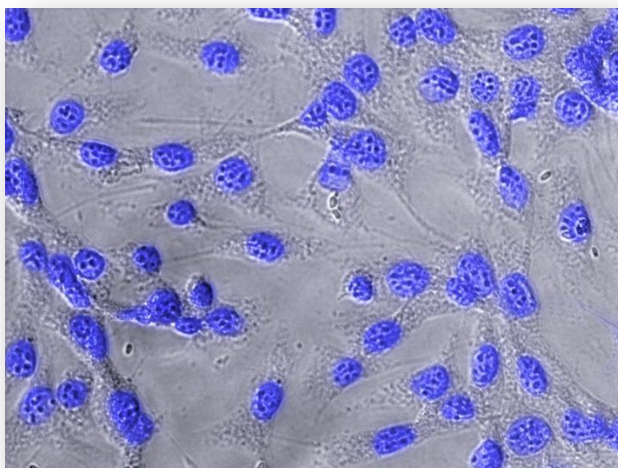
Rycina 15. Złogi wewnątrzkomórkowego A β w komórkach transfekowanych APP typu dzikiego (APPwt) oraz genem z mutacją szwedzką (APPsw)

Zdjęcia z mikroskopu elektronowego wykonane w Zakładzie Ultrastruktury Komórki. Złogi A β znakowano immunocytochemicznie 18 nm złotem połączonym z przeciwciałem przeciwko A β

Unieśmiertelniona linia mysich neuronów hipokampa – HT22

Immortalizowane mysie komórki hipokampa HT22 (**rycina 16**) otrzymano od Prof. Davida Schuberta z Salk Institute for Biological Studies, La Jolla. Komórki HT22 otrzymuje się z mysich neuronów hipokampa unieśmiertelnianych w wyniku inkubacji z onkogenem wrażliwym na temperaturę. W temperaturze 39°C działanie tego onkogenu zostaje wyeliminowane, a komórki zachowują charakterystyczne cechy zróżnicowanych neuronów (Frederiksen i McKay, 1988). Linia ta hodowana była w standardowej pożywce DMEM (Eagle'a) (Sigma) z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (FCS) inaktywowanej w 56°C,

zawierającej 2 mM glutaminę i antybiotyki (50 jednostek/ml penicyliny, 50 µg/ml streptomycyny). Hodowlę prowadzono w sterylnych jednorazowych plastikowych szalkach lub płytkach zawierających 24 dołki (Falcon), w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze nasyconej parą wodną i zawierającej 5% CO₂.



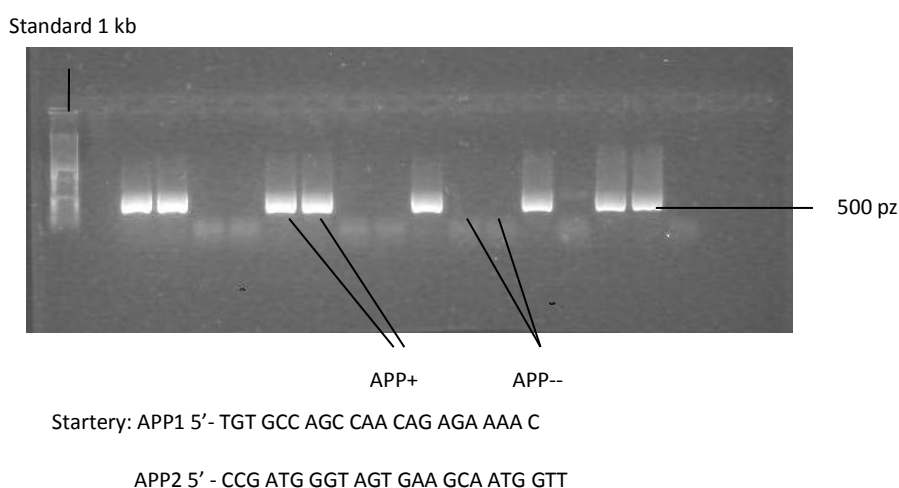
Rycina 16. Zdjęcie komórek HT22

Zdjęcie z mikroskopu fluorescencyjnego w kontraście fazowym z jądrami komórek wybarwionymi Hoechstem 33342

Zwierzęta doświadczalne

Do doświadczeń *in vivo* użyto trzymiesięcznych samic myszy FVB (APP^{-/-}) oraz myszy transgenicznym transfekowanych ludzkim genem z mutacją londyńską FVBTg(Thy1;APP)^{Val717Ile} (APP^{+/+}) o masie ciała około 30 - 40 g. Myszy transgeniczne APP^{+/+} z mutacją (Thy1;APP)^{Val717Ile} cechują się zaburzeniami w procesie proteolizy APP, zwiększonym stężeniem i kumulowaniem Aβ w mózgu. W genie APP występuje mutacja w okolicach cięcia przez γ-sekretazę, tzw. mutacja londyńska, gdzie aminokwas walina (Val) jest zastąpiony przez izoleucynę (Ile) w pozycji 717. Myszy FVBTg(Thy1;APP)^{Val717Ile} stanowią jeden ze zwierzęcych modeli rodzinnej postaci choroby Alzheimera, będącej zespołem zaburzeń neurodegeneracyjnych mózgu, które prowadzą do zaburzeń poznaw-

czych. Linia myszy FVBTg(Thy1;APP)^{Val717Ile} stworzona przez zespół prof. F. Van Leuvena, została sprowadzona do zwierzętarni IMDiK im. M. Mossakowskiego PAN w 2005 roku z Belgii. Hodowlę prowadzono przez kojarzenie zdrowych samic FVB z samcami z transgenem APP^{+/+}. Obecność genu APP sprawdzano u wszystkich myszy po urodzeniu metodą PCR. Po wyizolowaniu DNA z ogona myszy, 1 µg DNA dodano do mieszaniny reakcyjnej PCR zawierającej Taq PCR Master MIX i ze starterami APP1 5'- TGT GCC AGC CAA CAG AGA AAA C, APP2 5'- CCG ATG GGT AGT GAA GCA ATG GTT w całkowitej objętości 20 µl, następnie poddano reakcji amplifikacji w warunkach podanych przez producenta (rycina 17).



Rycina 17. Genotypowanie myszy z APP

Myszy hodowano w warunkach stabilnej temperatury, wilgotności i 12 godzinnym cyklu dnia/nocy. Myszy karmiono *ad libitum* standardową paszą granulowaną dla gryzoni „Ssniff® M-2 komplette diat” (Ssniff Spezialdoten GmbH, Soest, Niemcy) ze swobodnym dostępem do wody. Po dekapitacji izolowano różne części mózgu i przechowywano je w temperaturze -80°C.

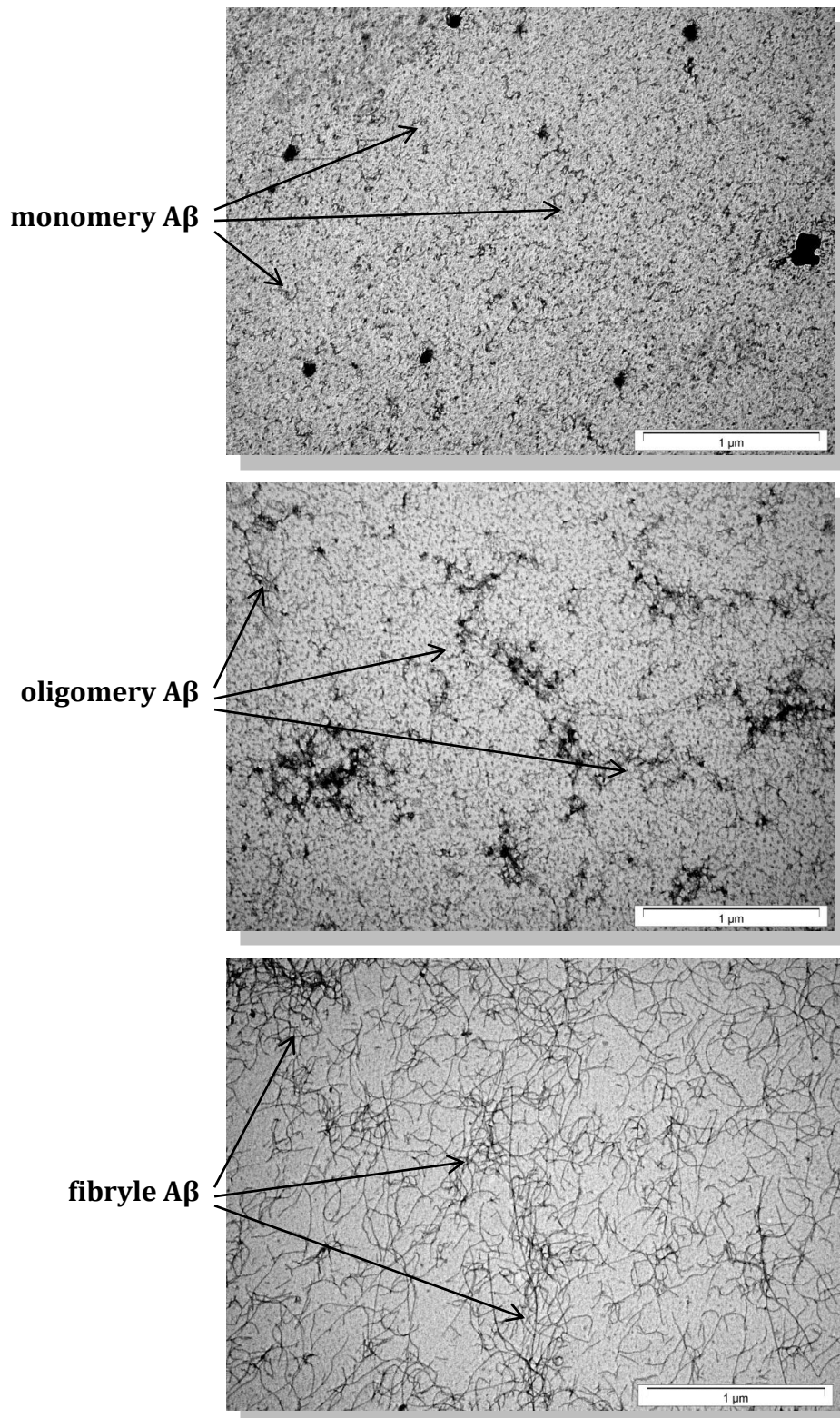
Doświadczenia z udziałem zwierząt były wykonywane zgodnie z zasadami prawa etycznego zgodnego z Konwencją Europejską, na podstawie zezwolenia wydanego przez IV Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach, z siedzibą w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie.

Modele doświadczalne

Model stresu oksydacyjnego wywołany: endogennie uwalnianymi peptydami amyloidu β , podaniem egzogennych peptydów $A\beta$ oraz donorem tlenu azotu - nitroprusydkiem sodu

Komórki szczurzego guza chromochłonnego (pheochromocytoza, PC12) stabilnie transfekowane ludzkim genem białka prekursorowego amyloidu β (APP) dzikiego typu (APPwt) lub z mutacją typu szwedzkiego (APPsw, K670M/N671L) w porównaniu do komórek kontrolnych transfekowanych pustym wektorem, charakteryzowały się zwiększonym stężeniem endogennie uwalnianych peptydów $A\beta$, oraz poziomem wolnych rodników. W celu porównania indukcji stresu oksydacyjnego i towarzyszących zjawisk molekularnych wywołanych przez endogennie uwalniany $A\beta$ z egzogennym $A\beta$ 1-42 działającym zewnątrzkomórkowo, do pożywki komórek PC12 dodawano $A\beta$ 1-42 w formie oligomerów i fibryli, a także donor tlenu azotu - nitroprusydek sodu (SNP). Komórki wysiewano na odpowiednie szalki, a po 24 h zmieniano pożywkę na DMEM zawierającą 2% FCS oraz 2 mM glutaminę i antybiotyki.

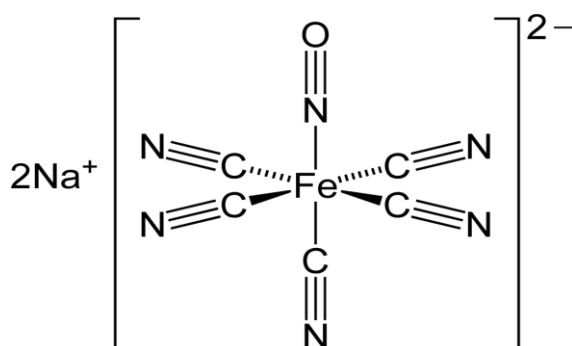
$A\beta$ 1-42 przygotowywano zgodnie z procedurą opisaną przez Dahlgrena i wsp. (2002) Liofilizowane peptydy $A\beta$ rozpuszczano w DMSO (Sigma) i przygotowywano 5 mM koncentrat monomerów. Monomery rozcieńczano 50 razy do stężenia 100 μ M i inkubowano odpowiednio dla otrzymania oligomerów w temperaturze 4°C przez 24 h w bogatym w sole mineralne, neutralnym medium F12 (Sigma) pH 7,0, a dla otrzymania fibryli inkubację przeprowadzano w temperaturze pokojowej przez 24 h w 10mM HCl (**rycina 18**). Oligomery i fibryle używane były w stężeniach 0,1, 1 i 10 μ M.



Rycina 18. Zdjęcia monomerów, oligomerów i fibryli amyloidu β przygotowanych wg metody opisanej przez Dahlgrena i wsp. (2002)

Zdjęcia z mikroskopu elektronowego wykonane w Zakładzie Ultrastruktury Komórki

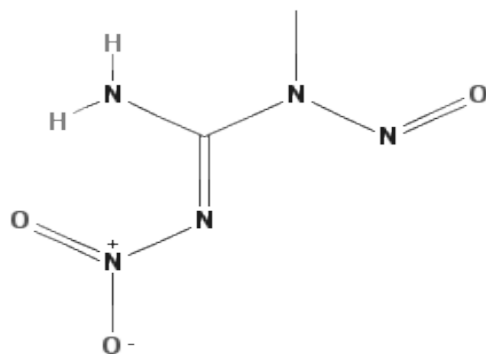
Nitroprusydek sodu (SNP), nieorganiczna sól występująca w postaci dwuhydratu $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ stosowana jest jako donor tlenu azotu (**rycina 19**). Egzogeny NO, podobnie jak endogeny, aktywuje cytozolową formę cyklazy guanylanowej, powodując wzrost wtórnego przekaźnika - cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP), a w dalszej kolejności poprzez PKG fosforylację wielu białek komórkowych, wpływając na różne ścieżki przekazywania sygnału. W trakcie działania SNP, oprócz NO uwalniane są również jony cyjankowe (CN^-), które w bardzo krótkim czasie metabolizowane są do tiocyjanków charakteryzujących się znikomą toksycznością lub brakiem toksyczności (Trajder i Abramczyk, 2004). W celu wywołania stresu oksydacyjnego SNP rozpuszczano w wodzie i dodawano do hodowli w stężeniu końcowym 0,1 - 0,5 mM na 2 do 24 h, jak opisano wcześniej w pracy Pytlowany i wsp. (2008).



Rycina 19. Nitroprusydek sodu - SNP (pentacyjanonitrożyłozelazian (2) disodowy)

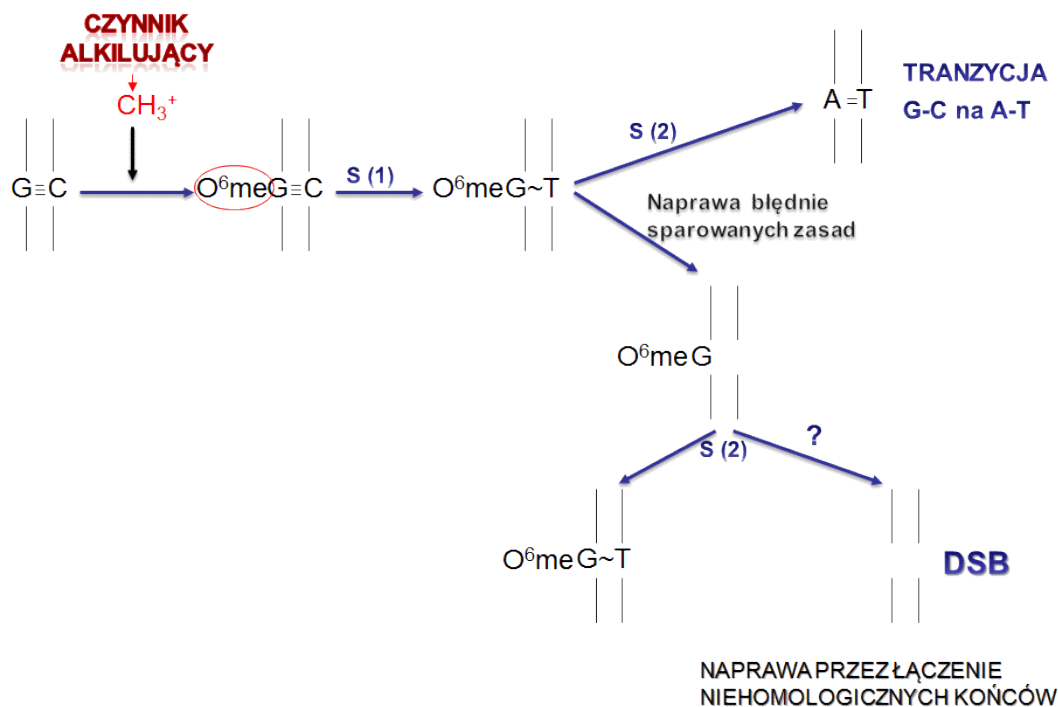
Model stresu genotoksycznego wywołanego MNNG

W celu indukcji stresu genotoksycznego, komórki HT22 oraz PC12 hodowano w obecności pochodnej nitrozomocznika, mocnego mutagenu, N-metylo-N-nitro-N-nitrozoguanidyny (MNNG) (**rycina 20**).



Rycina 20. N-metylo-N-nitro-N-nitrozoguanidyna, MNNG

MNNG jest czynnikiem działającym bezpośrednio przez kowalentne wiązanie do grupy metylowej DNA w pozycji O⁶ guaniny, tworząc O⁶ metyloguaninę, co prowadzi do powstania mutacji punktowych (tranzycja), a w dalszych przemianach może doprowadzać do dwuniciowego uszkodzenia nici DNA (rycina 21) (Niknahad i O'Brien, 1995; Margison i wsp., 2002).



Rycina 21. Efekty działania czynnika alkilującego DNA - MNNG w komórce

Hipotezy prowadzące do powstania DSB: równoczesna naprawa uszkodzeń leżących na przeciwnych niciach (Margison i wsp., 2002)

Po wysianiu komórek na odpowiednie szalki i zmianie pożywki na DMEM zawierający 2% FCS, glutaminę i antybiotyki, do hodowli dodawano rozpuszczony w DMSO MNNG w stężeniu końcowym 50 – 500 μM . Komórki kontrolne traktowane były samym DMSO.

Farmakologiczna modyfikacja odpowiedzi komórek na stres oksydacyjny wywołany peptydami A β i SNP oraz na stres genotoksyczny

W celu modulowania odpowiedzi komórek na peptydy A β , stres oksydacyjny i genotoksyczny zastosowano inhibitory w następujących stężeniach:

Inhibitory PARS-1 i PARG

- a) **PJ 34** 20 μM
- b) **3-AB** 5 mM
- c) **ADP-HDP** 0,5-1 μM

Potencjalne inhibitory PARS-1, antybiotyki z grupy tetracyklin

- d) **Doksycyklina** 2,5-20 μM
- e) **Minocyklina** 10-200 nM

Inhibitory apoptozy

- f) **Cyklosporyna A** 2 μM – inhibitor megakanalu mitochondrialnego
- g) **α -Pifitryna** 20 μM – inhibitor białka p53
- h) **Z-DEVD-FMK** 100 μM – inhibitor kaspazy 3
- i) **MDL 28170** 10 μM - inhibitor kalpain

Inhibitory PI3/Akt kinazy

- j) **LY294002** 50 μM – specyficzny inhibitor PI3-kinazy
- k) **Wortmanina** 200 nM – niespecyficzny inhibitor PI3-kinazy

Inhibitory kinaz białkowych

- l) **U0126** 5 μM – inhibitor kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK1/2)
- m) **KT5823** 5 μM – inhibitor kinazy białkowej G (PKG)

n) **GF109203x** 1 μ M - inhibitor kinazy białkowej C (PKC)

Inne

o) **DHA** 10-50 μ M - wielonienasycony kwas tłuszczowy dokozaheksaenowy (C_{22:6})

p) **DAPTA** 1 μ M – inhibitor γ -sekreazy

Komórki wysiewano na odpowiednie szalki, a po 24 h zmieniano pożywkę na DMEM zawierające 2% FCS oraz 2 mM glutaminę i antybiotyki. Inhibitory rozpuszczano odpowiednio w wodzie, etanolu lub w DMSO i dodawano do pożywki w stosunku 1:1000 w stężeniach podanych w opisie rycin, przy odpowiednich doświadczeniach. W większości doświadczeń inhibitory podawano tuż przed stresem. W przypadku gdy inhibitory podawane były w innym czasie, zostało to dokładnie oznaczone w tekście. Komórki najczęściej hodowano w obecności inhibitorów przez 24 h (w innych przypadkach dokładny opis w tekście pod rycinami).

Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz

Komórki na szalkach płukano dwukrotnie za pomocą PBS, zawieszano w buforze Tris-HCl pH 7,4 zawierającym inhibitory proteaz Complete (Roche Diagnostics GmbH), zeszkrobywano z szalek i sonifikowano. Tak przygotowany materiał przechowywano w temperaturze -20 °C i używano do oznaczeń immunochemicznych (western blot).

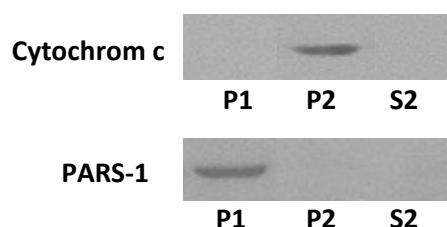
Otrzymywanie frakcji podkomórkowych

Przygotowanie frakcji podkomórkowych odbywało się wg metody opisanej przez Wang i wsp. (2004). Komórki hodowane na szalkach o średnicy 10 cm lub 6 cm płukano dwukrotnie buforem PBS (phosphate Buffer saline), a następnie zawieszano w buforze hipotonicznym zawierającym 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM DL-ditiotreitol (DTT) i mieszaninę inhibitorów proteaz Complete (Roche Diagnostics GmbH).

Po 5 minutowej inkubacji w 4 °C w w/w buforze, komórki homogenizowano za pomocą strzykawki z igłą o średnicy 45 mm, przeciągając tłok strzykawki 12 razy, co ustalono kontrolując jakość homogenizacji pod mikroskopem. Homogenat (10% w/v) wirowano 10 min z przyspieszeniem 500 g w 4°C. Osad (P1) zawierający zgrubną frakcję jądrową zawieszano w 25 mM buforze Tris-HCl o pH 7,4 z inhibitorami proteaz. Supernatant (S1) wirowano przez 15 min z przyspieszeniem 15000 g w 4°C, do otrzymania frakcji mitochondrialnej (P2) i cytozolowej (S2). Uzyskany w ten sposób materiał przechowywano w -20°C i używano do oznaczania białek metodą western blot.

Immunochemiczna analiza charakterystycznego dla mitochondriów białka cytochrom c wykazała, że jest ono obecne wyłącznie we frakcji mitochondrialnej. Natomiast specyficzna dla jąder syntaza poli(ADP-rybozy) obecna była jedynie we frakcji jądrowej (**rycina 22**).

Powyższe wyniki wskazywały na czystość przygotowywanych frakcji podkomórkowych.



Rycina 22. Analiza czystości frakcji subkomórkowych

Przykładowy obraz immunoreaktywności białek cytochromu c i PARS-1 badano metodą western blot. Rycina przedstawia przykładowy wynik, który jest reprezentatywny dla 5 niezależnych doświadczeń

Metody spektrofotometryczne

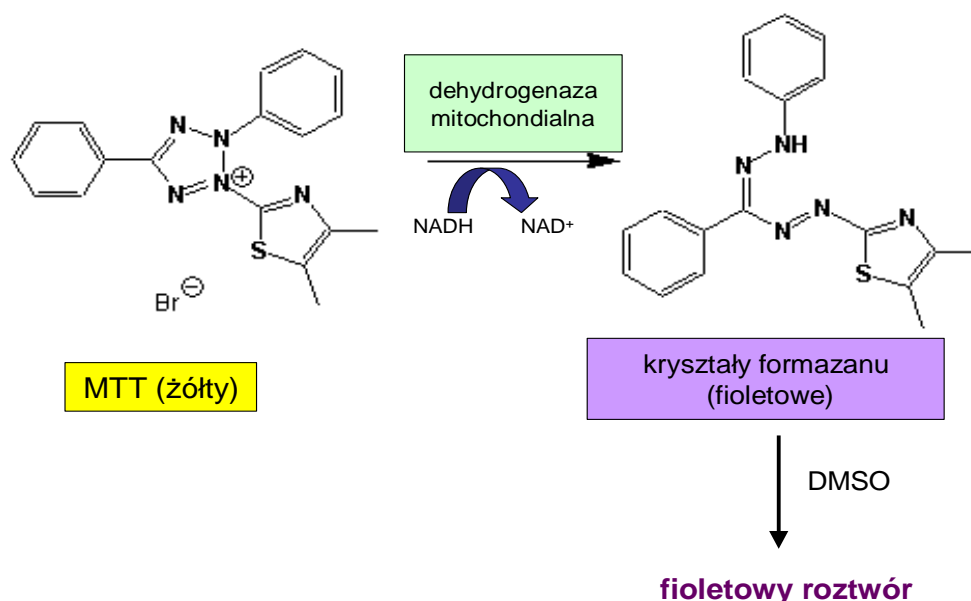
Oznaczanie zawartości białka

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, który opiera się na fakcie, że tylko żywe, aktywne metabolicznie komórki mogą przekształcać w 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 23**). Powstałe kryształy rozpuszczane są w DMSO. Dehydrogenaza NADH-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-dołkowe pokryte polietylenoiminą w ilości 2×10^5 komórek na dołek. Następnego dnia pożywkę wymieniano na taką z niską zawartością surowicy (2% FCS) i dodawano odpowiednio A β , SNP, MNNG oraz odpowiednie inhibitory. Po 24 h lub 48 h medium hodowlane wymieniano ponownie na pozbawione surowicy, dodawano MTT (0,25 mg/ml) i inkubowano przez 2 h w 37°C. Następnie pożywkę usuwano, a komórki rozpuszczano w DMSO i mierzono spektrofotometrycznie za pomocą czytnika do mikropłytek BioRad ich absorbancję, przy długości fali 595 nm.



Rycina 23. 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 na podstawie reakcji przekształcenia dwuoctanu 2',7-dichlorofluoresceiny ($H_2DCF-DA$), 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 Ischiropoulos, 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 h 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 miligram białka.

Badanie aktywności kaspazy-3

Aktywność kaspazy-3 analizowano metodą fluorymetryczną z użyciem zestawu CASP-3-F firmy Sigma. W metodzie wykorzystano pseudosubstrat acetylo-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metylokumarynę (Ac-DEVD-AMC; odwzorowujący miejsce cięcia w PARS: Asp-Glu-Val-Asp) i specyficzny inhibitor kaspazy-3 (Ac-DEVD-CHO). Frakcję cytozolową z komórek (około 300 μg białka) inkubowano 120 min w obecności Ac-DEVD-AMC ($16,66 \mu M$) w roztworze zawierającym 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 0,1 % CHAPS, 20 mM HEPES pH 7,4 w temperaturze pokojowej. Równoległe z próbą badaną wykonywano oznaczenie w obecności inhibitora kaspazy 3 (Ac-DEVD-CHO; $2 \mu M$). Pomiar stężenia fluorescencyjnego produktu uwolnionego w wyniku reakcji katalizowanej przez kaspazę-3 (7-amido-4-metylokumaryna) przeprowadzono po zakończonej inkubacji za pomocą spektrofluorymetru Perkin-Elmer LS50B przy długości fali

pobudzającej Ex: 360 nm i emitowanej Em: 460 nm. Aktywność kaspazy-3 wyliczano na podstawie krzywej wzorcowej AMC.

Oznaczanie aktywności syntazy tlenku azotu (NOS)

Aktywność syntazy NO oznaczano poprzez pomiar radioaktywnej [¹⁴C]L-cytruliny powstającej w equi-molarnych ilościach z NO ze znakowanej [¹⁴C]L-argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę NO w obecności kofaktorów wg metody opisanej przez Bredta i Syndera (1990) i zmodyfikowanej przez Hekera i wsp. (1994).

Homogenat komórek (300 µg białka) inkubowano w środowisku zawierającym 100 µM [¹⁴C]L-argininę [0,1µCi], 2 mM CaCl₂, 1mM NADPH, 15 µM FAD, 10 µM tetrahydrobiopterynę (H₄B), 1 µM kalmodulinę, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, w końcowej objętości 300 µl. Próby zerowe nie zawierały białka. Inkubację prowadzono przez 30 min w 37°C. Następnie reakcję przerywano przez dodanie 1 ml zimnego buforu 100 mM Tris-HCl z 10 mM EGTA, pH 5,5. Po odwirowaniu przy 3000 g przez 10 min, nadsącz (0,5 ml) nanoszono na kolumnę zawierającą 0,5 ml Dowex™ 50WX-8 (w formie Na⁺) i przemywano dwukrotnie 1 ml wody. Radioaktywność [¹⁴C]L-cytruliny w eluacie mierzono używając płynu scyntylicyjnego Braya w liczniku scyntylicyjnym LKB Wallac 1409 stosując czas zliczania 5 min. Ilość powstającej radioaktywnej L-cytruliny w wyniku reakcji NOS-u obliczano w nmol/mg białka.

Metody immunochemiczne

Immunodetekcja białek metoda western blot

Immunochemiczną metodą western blot oznaczano poziom AIF, PARS-1, PAR, Cytochrom c, GAPDH oraz β-aktyny. Homogenat (40 µg białka) mieszano z buforem denaturująco-obciążającym Laemmli (1970), o składzie 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 100 mM DTT, 20% glicerol i 0,2% błękit bromofenolowy. Próbkę następnie ogrzewano przez 5 min w temp. 95°C. Białka rozdzielano na żelu poliakrylamidowym i przenoszono na błonę z polifluorku winylidenu

(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 wolnej od kwasów tłuszczowych (Sigma) w temperaturze pokojowej przez 60 min, w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał (szczegółowe warunki reakcji dla poszczególnych białek podano w **tabeli 4**).

Oznaczone białko	Gęstość żelu	Bufor	Blokowanie	Przeciwciało		
				I-rzędowe	II-rzędowe	
AIF	10%	TBS-Tween	5% mleko odtłuszczone	Mysie, monoklonalne, przeciw AIF (N-216), Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc438	1:750 w 2% mleku w TBS-Tween 20%	Antymysie Amersham Pharmacia Biotech NA931V1:1000
PARS-1	10%	PBS-Tween	0,5% BSA	Mysie, poliklonalne, przeciw PARS-1, Cayman Chemical, 160126	1:500 1% BSA w PBS-Tween 20%	Antymysie Amersham Pharmacia Biotech NA931V1:1000
PAR	10%	TBS-Tween	0,5% mleko odtłuszczone	Mysie monoklonalne, przeciw poli(ADP-rybozie) (10H) (Alexis)	1:500 w TBS-Tween 20%	Antymysie Amersham Pharmacia Biotech NA931V1:1000
Cytochrom c	10%	PBS-Tween	5% mleko odtłuszczone	Mysie, poliklonalne, przeciw cytochromowi c, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Sc-372	1:500 w 5% mleku w PBS-Tween 20%	Antymysie Amersham Pharmacia Biotech NA931V1:1000
GAPDH	10%	TBS-Tween	5% mleko odtłuszczone	Królicze, poliklonalne przeciw GAPDH, Sigma G9545	1:500 w 5% mleku w TBS-Tween 20%	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% BSA w PBS-Tween 20%	Antymysie Amersham Pharmacia Biotech NA931V1:1000

Tabela 4. Warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych oznaczeń

TBS-Tween – bufor Tris o składzie 50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20

PBS-Tween – bufor fosforanowy o składzie 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, pH 7,4, 0,1% Tween-20

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 h w roztworze drugorzędowego przeciwciała sprzężonego z peroksydazą chrzanową. Niezwiązane specyficznie przeciwciała usuwano 3-krotnie płuczając błony przez 10 min w odpowiednim buforze. Następnie 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, pH 2,0 w celu odmycia związanych przeciwciał i płukano 3 x 15 min w TBS-Tween, po czym używano do kolejnych oznaczeń immunochemicznych.

Oznaczanie poziomu amyloidu β 1-40 przy użyciu metody ELISA

Komórki hodowano na szalkach 35-mm i po upływie 48 h medium komórkowe przenoszono do probówek i odwirowywano w 10000 g przez 5 min. Stężenie A β 1-40 w medium komórkowym oznaczano metodą ELISA (testem immunoenzymatycznym) z użyciem odpowiedniego zestawu (The Genetics Company) zgodnie z zaleceniami producenta. A β 1-40 wiąże się z przeciwciałem umieszczonym na płytce, które selektywnie rozpoznaje i wiąże N-koniec peptydu A β 1-40. Powstały koniugat jest następnie związany przez kompleks Biotyna-Streptawidyna-Enzym. W końcowym etapie reakcji ELISA związany enzym przeprowadza bezbarwny substrat w kolorowy produkt, którego absorbancję mierzono w ciągu 30 min za pomocą czytnika mikropłytek Bio-rad 3550-UV przy długości fali 450 nm. Stężenie A β wyrażone w pg/ml wyliczano na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej z syntetycznego A β

Metody radiochemiczne

Oznaczanie aktywności syntazy poli(ADP-rybozy)

Aktywności PARS-1 badano w homogenacie komórek PC12. Homogenat inkubowano przez 30 min w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Po inkubacji oznaczano aktywność PARS przy użyciu radioaktywnego substratu [¹⁴C]dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD). Mieszanina reakcyjna w końcowej objętości 100 µl zawierała 200 µM (4×10^5 dpm) [Ade-U ¹⁴C] NAD (specyficzna aktywność: 248 mCi/mmol), 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT (ditiotretitol) oraz 200 µg białka. Reakcję przeprowadzano przez 1 min w temperaturze 37°C. Reakcję zatrzymywano 0,8 ml 25% zimnego kwasu trójchlorooctowego (TCA). Następnie próby przesączano pod ciśnieniem stosując filtry Whatman GF/B i pięciokrotnie przepłukiwano 3 ml 5% TCA. Radioaktywność włączonej poli(ADP-rybozy) w białkach zatrzymanych na filtrach oznaczano w scyntylicatorze Braya w liczniku scyntylicyjnym LKB Wallac 1409 stosując czas zliczania 5 min.

Analiza ekspresji genów

Izolacja RNA

Całkowite RNA izolowano z komórek w warunkach sterylnych, zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego i Sacchi (1987), używając odczynnika TRI-reagent (Sigma). Komórki hodowane na szalkach o średnicy 6 cm płukano dwukrotnie buforem PBS, a następnie zawieszano w 1 ml odczynnika TRI-reagent, pozostawiano na 5 min i homogenizowano. Następnie do 1 ml homogenatu dodawano 200 µl chloroformu, energicznie mieszano przez około 15 s i pozostawiano na 15 min w temperaturze pokojowej. Próby wirowano przy obrotach 12000 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 g w 4°C. Otrzymany osad przemywano trzykrotnie 1 ml 75% etanolu. Po kilkuminutowym odparowaniu eta-

nolu z próbek, osad RNA zawieszano w 20 μ l wody pozbawionej RNAz (Promega Corporation). Mierzono ilość otrzymanego RNA metodą spektrofotometryczną przy długości fali 260 nm oraz zanieczyszczenie RNA białkami i 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 mRNA z pozostałości DNA komórkowego, do próbek 1,5 ml przenoszono 5 μ g mRNA i uzupełniano odczynnikami do trawienia DNA firmy Promega Corporation do 10 μ l. Po przygotowaniu mieszaninę reakcyjną inkubowano 15 min w RT. Następnie dodano 1 μ l 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 μ g) było matrycą dla działania odwrotnej transkryptazy. W reakcji odwrotnej transkrypcji otrzymywano DNA komplementarne do mRNA (cDNA). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w 42°C przez 15 min przy użyciu zestawu odczynników firmy Promega Corporation, w końcowej objętości 20 μ l. 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 AIF, PARS-1, nNOS, iNOS, 12/15LOX, Bcl1, Bcl2, Bax, Aktyny oraz Gapdh analizowano za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*). Na matrycy cDNA uzyskanej z 1 μ g RNA przeprowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym przy

użyciu odpowiednich sond Taq-Man (Applied Biosystems). Zastosowano następujące warunki reakcji: (94 °C-30 sek., 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 (ACTB).

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

Badanie morfologii komórek oraz apoptozy przy zastosowaniu mikroskopii fluorescencyjnej

Morfologię komórek oraz procent śmierci apoptotycznej badano przy użyciu barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33342 (Sigma). Barwienie jąder komórkowych za pomocą tego barwnika pozwala na wizualizację kondensacji i agregacji DNA charakterystycznych dla apoptozy. Komórki wysiewano na szalki o średnicy 35 mm pokryte polietylenoiminą. Po inkubacji z badanymi związkami komórki płukano zimnym buforem PBS, a następnie zalewano 1 ml zmrożonego metanolu i utrwalano przez 30 min w temperaturze -20°C. Barwienie wykonywano poprzez inkubację z barwnikiem Hoechst 33342 o stężeniu 1 ng/ml w buforze fosforanowym przez 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie komórki płukano w buforze PBS. Wybarwione jądra analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym Olympus IX71 i fotografowano z użyciem kamery cyfrowej Olympus U-CMAD3 zintegrowanej z mikroskopem przy długości fali pobudzającej Ex: 340 nm i emitowanej Em: 510 nm przy użyciu 40-krotnego powiększenia.

Badania w mikroskopie elektronowym wykonane były w Zakładzie Ultrastruktury Komórki IMDiK PAN, dzięki uprzejmości Prof. dr hab. n. med. Barbary Gajkowskiej.

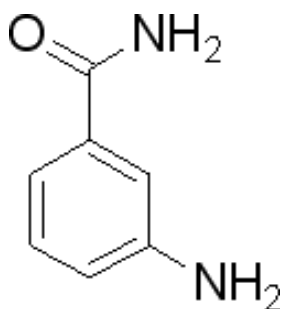
Charakterystyka zastosowanych związków chemicznych

Inhibitory PARS-1

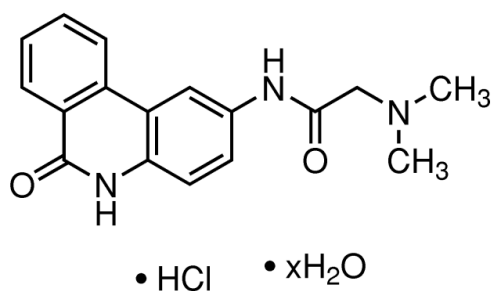
Większość znanych inhibitorów PARS-1 wykazuje strukturalną analogię do substratu PARS-1 dinukleotydu nikotyno-amido-adeninowego. Przyłączają się one do centrum aktywnego enzymu, blokując miejsce wiązania dla NAD^+ i hamując tym samym reakcję powstawania PAR (Szabo i wsp., 2006).

W badaniach stosowano dwa inhibitory PARS-1 nowej generacji:

- 3-Aminobenzamid (3-AB, Sigma)** – inhibitor PARS, rozpuszczalny w DMSO i stosowany w stężeniu 5 mM.
- PJ 34** (chlorowodorek N-(6-okso-5,6-dihydrofenantrydyn-2-yl)-(N,N-dimetylamino)acetamidu, Sigma) – silny, specyficzny inhibitor PARS ($K_i = 20$ nM). W zakresie stężeń od 1 μM do 10 mM nie wykazuje działania antyoksydacyjnego. Rozpuszczalny w wodzie, stosowany w stężeniu 20 μM (**rycina 24**).



3-AB

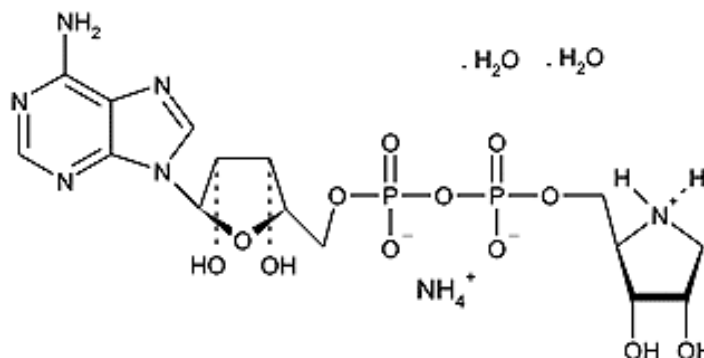


PJ 34

Rycina 24. Wzory chemiczne inhibitorów PARP-1 (PJ 34 i 3-AB)

Oraz inhibitor PARG

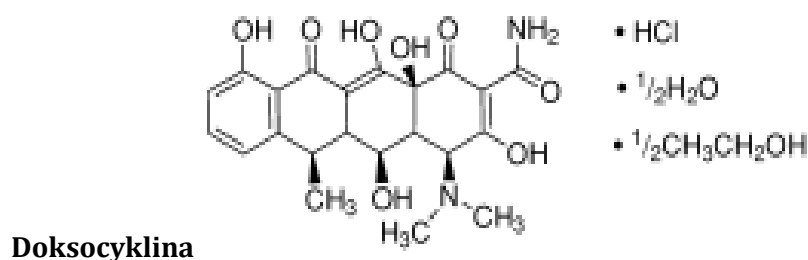
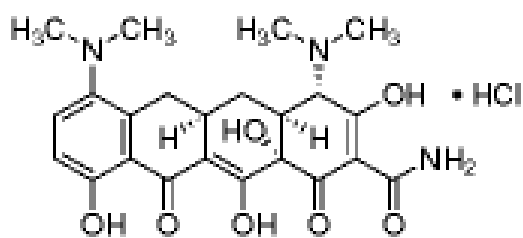
- a) **ADP-HDP** (adenozyno 5'-difosfate (hydroxymetyl) pirolidinediol. $\text{NH}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Alexis). Specyficzny inhibitor glikohydrolazy poli(ADP-rybozy) (PARG), który nawet w stężeniu 1mM nie wpływa na aktywność PARP-1. Rozpuszczalny w wodzie, stosowany w zakresie stężeń 0,5 - 1 μM (rycyna 25).



Rycina 25. Wzór chemiczny inhibitora PARG – ADP-HDP

Do stale powiększającej się rodziny inhibitorów PARS-1 w ostatnich latach dołączyły antybiotyki tetracyklinowe III generacji:

- a) **Minocyklina** (Sigma) - właściwości inhibitora PARS (porównywalne do PJ34) widoczne są już w stężeniach nanomolowych. Stąd też duże zainteresowanie tym związkiem, jako potencjalnym terapeutycznym w chorobach neurodegeneracyjnych. Rozpuszczalna w wodzie, stosowana w stężeniach 50-200 nM.
- b) **Doksycyklina** (Sigma) – rozpuszczalna w wodzie, stosowana w stężeniach 50-200 μM (rycyna 26).



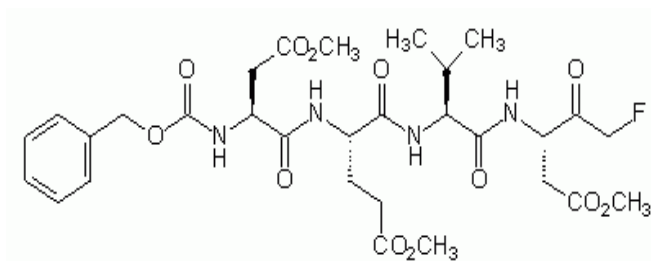
Rycina 26. Wzory chemiczne antybiotyków (tertracyklin) – potencjalnych inhibitorów PARS-1

Inhibitory kaspaz i innych białek zaangażowanych w proces apoptozy

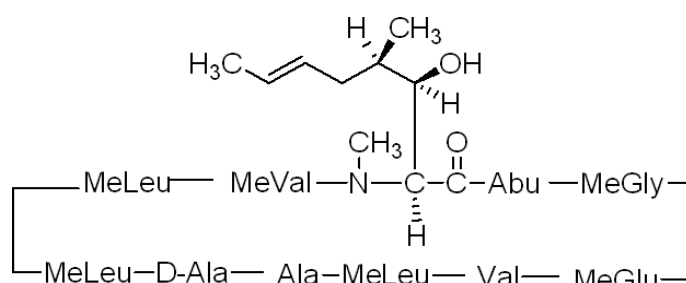
- a) **Z-DEVD-FMK** (keton Z-Asp(O-Me)-Glu(O-Me)-Val-Asp(O-Me)fluorometylowy, Sigma) – nieodwracalny inhibitor kaspazy-3. Hamuje również niespecyficznie kaspazę 6, 7, 8 i 10. Rozpuszczalny w DMSO, stosowany w stężeniu 100 μM .
- b) **Cyklosporyna A** ((E)-14,17,26,32-tetrabutyl-5-etylo-8-(1-hydroksy-2-metyloheks-4-enylo)-1,3,9,12,15,18,20,23,27-nonametylo-11,29-dipropyl-10,3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-undekacyklodotriakontan-2,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undekanon, Sigma) – związek o działaniu immunosupresyjnym, również bloker megakanałów mitochondrialnych. Rozpuszczalny w etanolu, stosowany w stężeniu 2 μM .
- c) **α -Pifithrin** (bromowodorek 2-(2-imino-4,5,6,7-tetrahydrobenzotiazol-3-yl)-1-p-toliloetanonu, Sigma) – specyficzny

inhibitor białka p53 ($K_i = 2,2 \text{ nM}$). Rozpuszczalny w DMSO, stosowany w stężeniu $20 \mu\text{M}$.

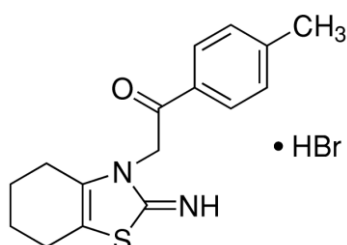
- d) **MDL28170** (karbobenzoxy-valinyl-fenylalaninal, Merck) – specyficzny inhibitor zależnych od Ca^{2+} proteaz – μ -kalpajny i m-kalpajny ($K_i = 8 \text{ nM}$). Rozpuszczalny w wodzie i stosowany w stężeniu $10 \mu\text{M}$ (rycina 27).



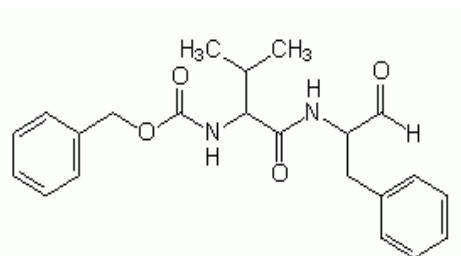
Z-DEVD-FMK



Cyklosporyna A



α -Pifithrin



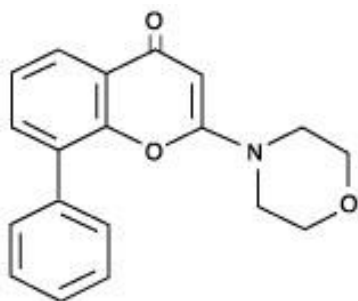
MDL28170

Rycina 27. Wzory chemiczne związków, które są inhibitorami procesu apoptozy

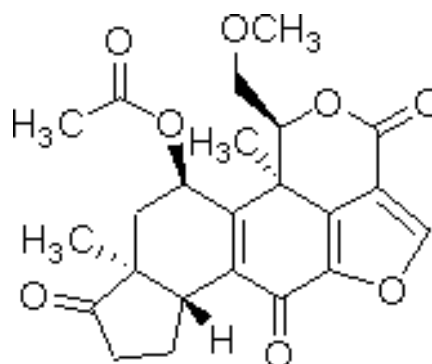
Inhibitory kinaz

Inhibitory kinazy PI3/Akt

- a) **LY294002** (2-morfolin-4-yl-8-fenylchromen-4-one, Cell Signaling) – specyficzny inhibitor aktywności PI3-kinazy, nie wpływa na aktywność innych kinaz (np. PI-4 kinazy) ($K_i = 1,4 \mu\text{M}$). Rozpuszczalny w DMSO, stosowany w stężeniu $50 \mu\text{M}$.
- b) **Wortmanina** (Sigma) – furanosteroid o właściwościach kowalencyjnego inhibitora ścieżki sygnałowej PI3-kinazy, silniejszych niż LY294002 ($K_i = 2\text{-}4 \text{ nM}$). W wyższych stężeniach może hamować enzymy związane z PI3-kinazą takie, jak mTOR, DNA-PK, PI-4 kinazę, MAPK. Rozpuszczalna w DMSO, stosowana w stężeniach $100\text{-}250 \text{ nM}$ (**rycina 28**).



LY294002



Wortmanina

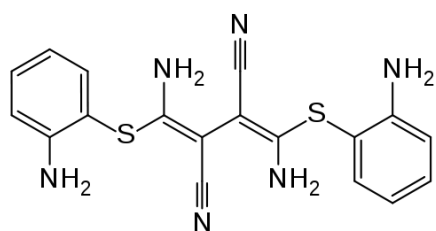
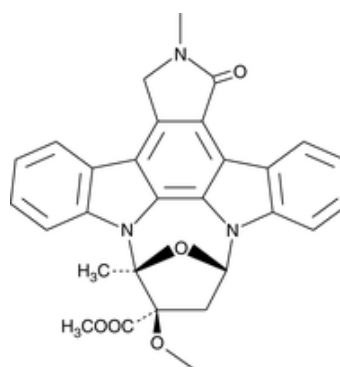
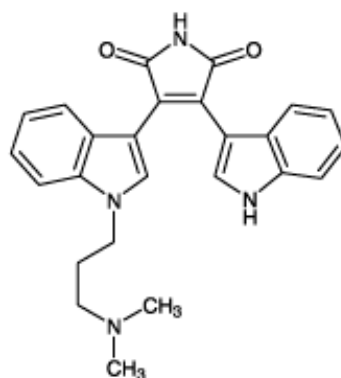
Rycina 28. Wzory chemiczne związków będących inhibitorami ścieżki sygnałowej PI-3 kinazy

Inhibitory kinaz białkowych

- a) **U0126** (1,4-diamino-2,3-dicyjano-1,4-bis[2-aminofenylio] butadiene) wysoko specyficzny inhibitor kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK1 i ERK2). Rozpuszczalny w DMSO, stosowany w stężeniu $5 \mu\text{M}$.
- b) **KT5823** (ester kwasu 2,3,9,10,11,12-hexahydro-10R-meoxy-2,9-dimethyl-1-oxo-9S,12R-epoxy-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocine-10-karboksylowy, Cayman

Chemicals) – inhibitor kinazy białkowej G, PKG ($K_i = 243$ nM). Wykazuje też słabe właściwości hamujące dla PKA i PKC. Rozpuszczalny w DMSO, stosowany w stężeniu $5 \mu\text{M}$.

- c) **GF109203x** ([2-[1-(3-Dimetyloaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)malimid, Bisindolilmaleimid I], Enzo Life Sciences) - selektywny inhibitor kinazy białkowej C, PKC ($K_i = 20$ nM). Hamuje z podobną mocą α , βI , βII i γ podtypy PKC. W wyższych stężeniach może hamować PKA. Rozpuszczalny w DMSO, stosowany w stężeniu $1 \mu\text{M}$. (**rycina 29**).

**U0126****KT5823****GF109203x****Rycina 29. Wzory chemiczne kinaz białkowych**

Kwas dokozaheksaenowy (DHA)

W badaniach został także zastosowany związek o właściwościach neuroprotekcyjnych:

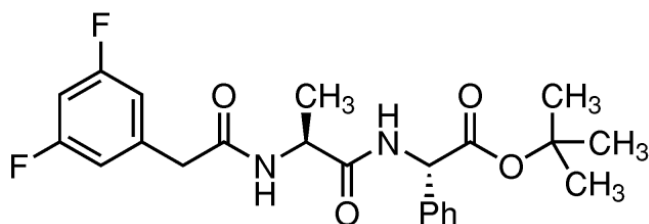
DHA (kwas cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenowy, Sigma) – należący do grupy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) omega-3 [$C_{22}:6; n=3$]. Rozpuszczalny w DMSO i stosowany w stężeniu 10-50 μM (**rycina 30**).



Rycina 30. Wzór chemiczny kwasu DHA.

Inhibitor γ -sekreazy

DAPT (Ester N-[N-(3,5-Difluorofenacetyl)-L-alanil]-S-fenilglicyn t-butyl, Sigma) – selektywny inhibitor γ -sekreazy. Rozpuszczalny w DMSO i stosowany w stężeniu 1 μM (**rycina 31**).



Rycina 31. Wzór chemiczny inhibitor γ -sekreazy

Statystyczne opracowanie wyników

Przeprowadzono od 3 do 4 doświadczeń w każdej grupie badanej. Oznaczenie wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach. Za ostateczny wynik przyjmowano wartość średnią \pm 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 testem-t lub odpowiednio jedno- lub dwuczynnikową 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

Celem niniejszej pracy było poznanie udziału białka AIF w toksyczności peptydów A β , z uwzględnieniem czynników zaangażowanych w aktywację stresu oksydacyjnego i genotoksycznego. Ponadto udział AIF w mechanizmie śmierci komórek badano w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego czynnikiem alkilującym DNA (MNNG). Szczególną uwagę zwrócono na aktywność i integralność PARS-1. Badania prowadzono na komórkach pochodzenia nerwowego PC12, transfekowanych ludzkim genem dla białka prekursorowego A β typu dzikiego (APPwt) i genem z mutacją szwedzką (APPsw), endogennie uwalniających peptydy A β . Badano także komórki PC12 poddane zewnątrzkomórkowemu działaniu egzogennych peptydów A β . Wyniki dotyczące poziomu AIF po działaniu peptydów A β porównywano z danymi uzyskanymi w badaniach na zwierzętach transgenicznych - myszach FVBtg(Thy1;APP)^{Val717Ile}, które stanowią model rodzinnej choroby Alzheimerera. W badaniach molekularnych zjawisk wpływających na poziom AIF w mitochondriach i jego translokację do jądra, szczególną uwagę zwrócono na aktywność i integralność PARS-1.

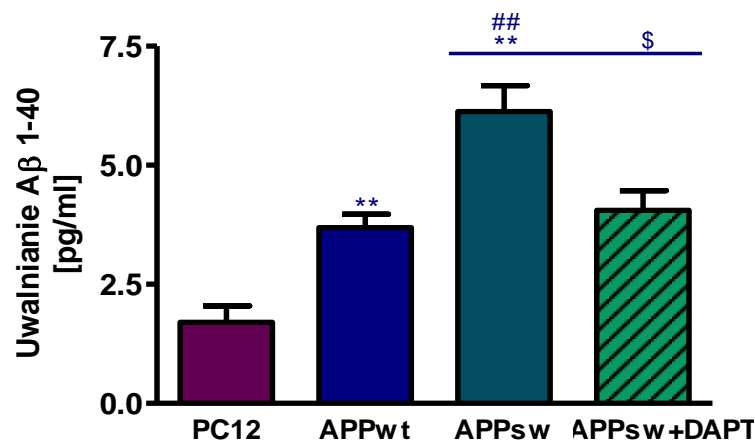
Badanie ekspresji i poziomu białka AIF w mitochondriach oraz stresu oksydacyjnego w warunkach zwiększonej sekrecji peptydów A β w komórkach transfekowanych genem ludzkim dla białka APP

Hipoteza kaskady amyloidu β zakłada, że w rozwoju choroby Alzheimerera najważniejsze zmiany dotyczą zaburzeń metabolizmu białka prekursorowego A β (APP) i nadmiernego uwalniania peptydów A β (Selkoe i wsp., 1991; Hardy i Higgins, 1992).

Prowadzone dořwiadczenia miały na celu określenie wpływu stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem A β produkowanego wewnątrzkomórkowo. Badania prowadzono w trzech liniach komórek PC12: transfekowanych pustym wektorem – kontrolnych (PC12) oraz genem APP typu dzikiego – (APPwt) lub z podwójną szwedzką mutacją (APPsw, K670M/N671L). Analizowano wpływ A β , ze szczególnym uwzględnieniem roli wolnych rodników oraz białek, takich jak AIF i PARS-1, w procesach przeżycia i śmierci.

Badania rozpoczęto od oznaczenia poziomu uwalnianych zewnątrzkomórkowo peptydów A β 1-40 metodą ELISA w trzech liniach komórek PC12. Dodatkowo zbadano wpływ inhibitora γ -sekreazy - DAPT, enzymu odpowiedzialnego za cięcie APP i uwalnianie toksycznego A β .

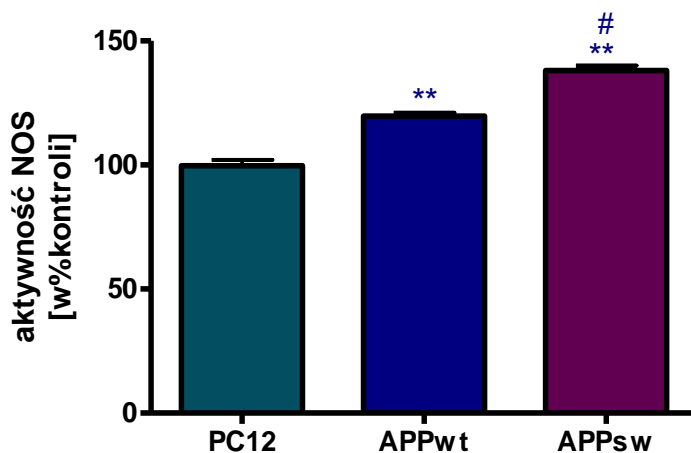
Analiza wykazała, że komórki transfekowane ludzkim genem dla APP uwalniają 2,1 razy, a komórki z genem z mutacją szwedzką 3,6 razy więcej A β niż komórki kontrolne. Zastosowany inhibitor γ -sekreazy - DAPT powodował znaczne obniżenie stężenia uwalnianych peptydów A β przez komórki APPsw, w stosunku do kontroli (**rycina 32**).



Rycina 32. Poziom uwalnianych peptydów Aβ 1-40 w komórkach PC12 kontrolnych i transfekowanych genem dla białka APP (APPwt i APPsw) oraz wpływ inhibitora γ-sekretazy

W komórkach PC12, APPwt i APPsw ilość uwolnionego zewnątrzkomórkowo Aβ 1-40 oznaczano metodą ELISA. Dodatkowo komórki APPsw przez 48h inkubowano z inhibitorem γ-sekretazy (1 μM DAPT). Wyniki przedstawiono w pg/ml. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną ± SEM z trzech niezależnych doświadczeń. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Bonferroni. ** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek PC12 kontrolnych, $p < 0,01$; ##- Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek APPwt $p < 0,01$. \$- Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek APPsw, $p < 0,05$

W celu zbadania udziału NO w stresie oksydacyjnym w warunkach zwiększonego uwalniania peptydów Aβ zbadano aktywność syntazy tlenku azotu (NOS). Aktywność tę badano metodą radiochemiczną z użyciem znakowanej [14C]L-argininy. Otrzymane wyniki wskazują, że wraz ze wzrostem stężenia uwalnianych peptydów Aβ wzrasta aktywność NOS (**rycina 33**).



Rycina 33. Wpływ peptydów A β komórek transfekowanych APP na aktywność syntazy tlenu azotu (NOS)

Komórki PC12, APPwt i APPsw homogenizowano i w uzyskanych homogenatach mierzono aktywność NOS. Wyniki wyrażono w % kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Bonferroni. ** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli $p < 0,01$; # - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek APPwt $p < 0,05$

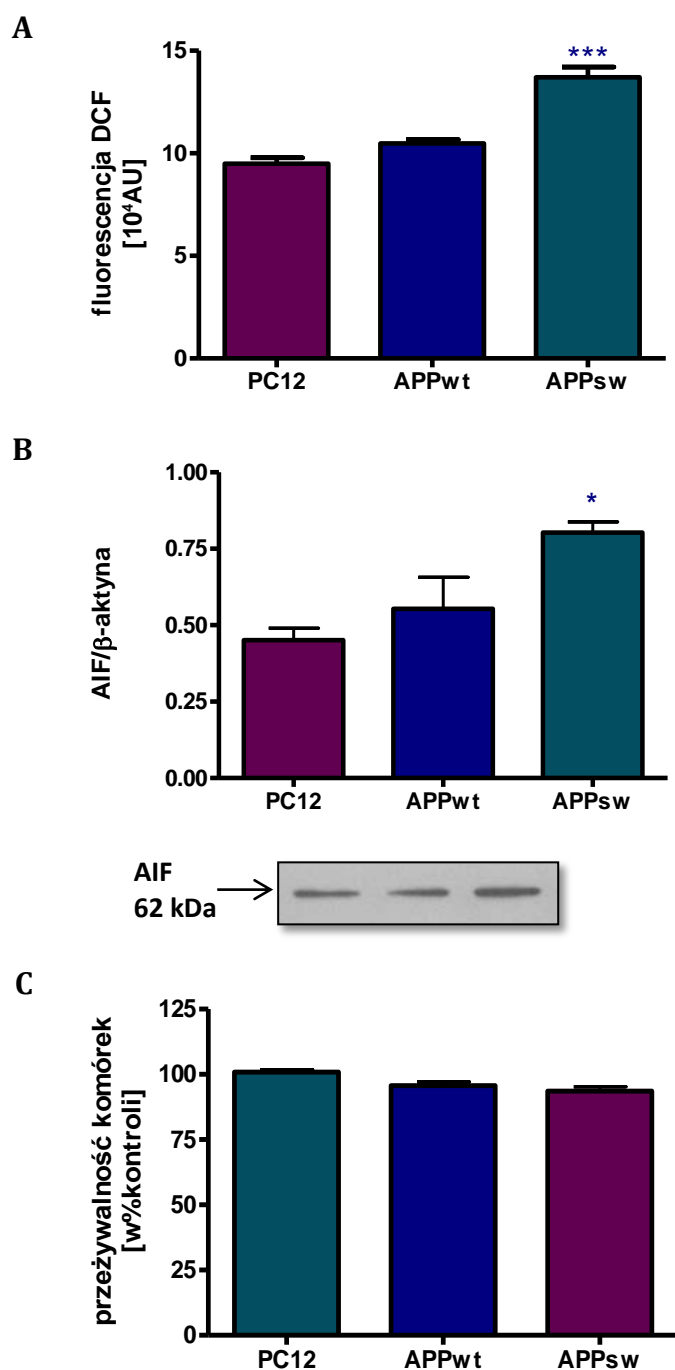
Wzrost aktywności NOS i związane z nim zwiększone uwalnianie NO mogą prowadzić do wzrostu stresu oksydacyjnego, a także uszkodzenia mitochondriów i w dalszej kolejności do obumierania komórek.

Kolejne doświadczenia miały na celu sprawdzenie, jak zwiększona ekspresja APP i podwyższone uwalnianie peptydów A β wpływa na poziom wolnych rodników, a także funkcje mitochondriów i przeżywalność komórek. W warunkach tych zbadano również poziom białka AIF, który w zależności od działających czynników, może brać aktywny udział w utrzymaniu prawidłowej funkcji mitochondriów lub też prowadzić do apoptozy.

Poziom wolnych rodników analizowano poprzez pomiar utleniania sondy dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCF-DA). Stwierdzono zamienny $\pm 60\%$ wzrost poziomu wolnych rodników w komórkach APPsw (**rycina 34A**), w któ-

rych r3wnoczeřnie wykazano najwyřszy poziom sekrecji A β (**rycina 32**). Przeprowadzona analiza western blot wykazała, że w kom3rkach tych poziom immunoreaktywnořci AIF wzrasta dwukrotnie w stosunku do kontroli (**rycina 34B**). W tych samych warunkach nie zaobserwowano zmian w ekspresji genu dla tego białka. Poziom mRNA utrzymywał się na stałym poziomie (dane nieprezentowane).

Zbadana została przeżywalnořć kom3rek transfekowanych APP, charakteryzujących się zwi3kszoną sekrecją peptyd3w A β . Do okreřlenia żywotnořci kom3rek uřyto testu metabolicznego MTT, który jest wskaźnikiem funkcji mitochondri3w oraz koreluje z liczbą żywych kom3rek. Uzyskane wyniki wykazały, że zwi3kszone uwalnianie A β w kom3rkach transfekowanych APP nie wpływa na ich przeżywalnořć (**rycina 34C**).



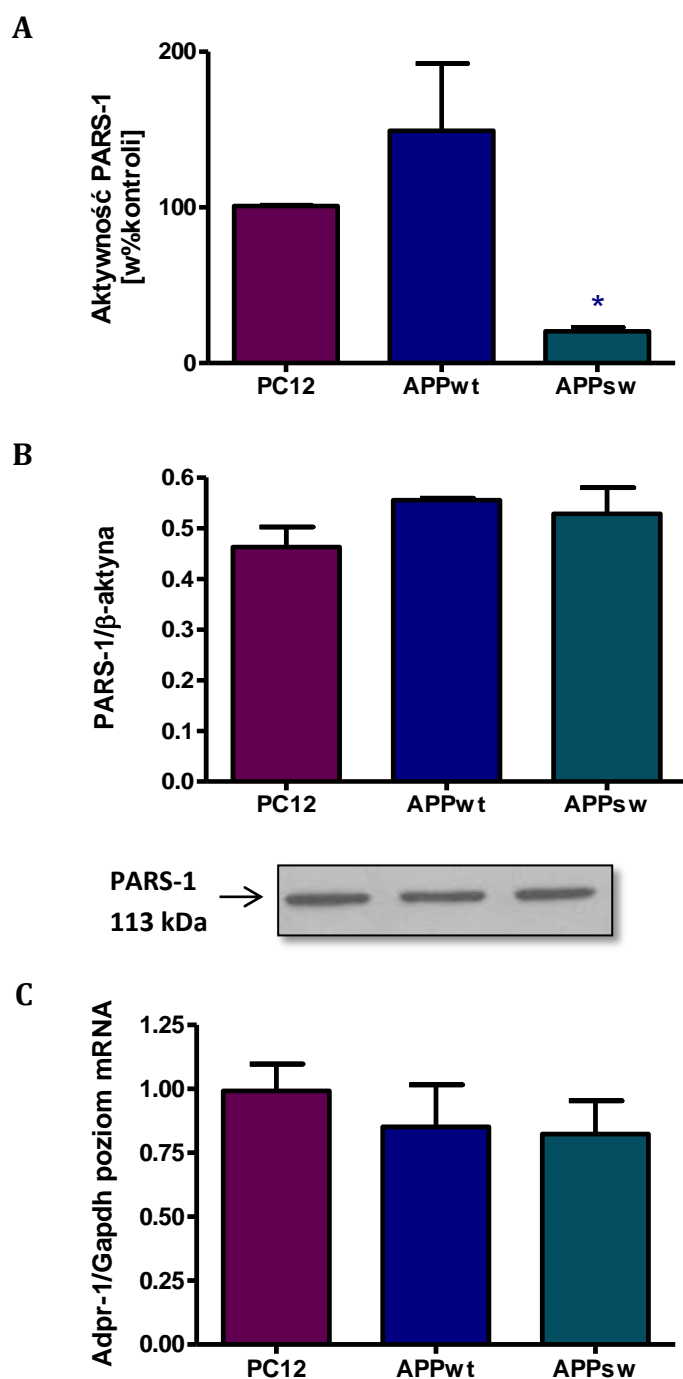
Rycina 34. Poziom wolnych rodników, immunoreaktywność AIF oraz przeżywalność komórek PC12 kontrolnych i transfekowanych genem dla białka APP

A) Poziom wolnych rodników oznaczano metodą fluorymetryczną z zastosowaniem DCF. Wyniki wyrażono, jako intensywność fluorescencji. B) Badana metodą western blot immunoreaktywność AIF przedstawiona w postaci analizy densytometrycznej normalizowanej względem β-aktyny. C) Badana testem MTT przeżywalność komórek. Wykresy stanowią średnią arytmetyczną z trzech lub czterech niezależnych doświadczeń ± SEM. Pod wykresem B zamieszczono przykładowy wyniki western blot. Do oceny statystycznej zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keuls. ***, $p < 0,001$. *, $p < 0,05$. - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli

Immunoreaktywność PARS-1 w warunkach stresu oksydacyjnego w komórkach transfekowanych genem dla białka APP charakteryzujących się zwiększonym uwalnianiem peptydów A β

PARS-1 jest enzymem niezmiernie wrażliwym na stres oksydacyjny, a w szczególności na związane z nim uszkodzenia DNA. W doświadczeniach zbadano aktywność i ekspresję genu dla PARS-1 w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego zwiększonym uwalnianiem peptydów A β w trzech liniach komórek PC12.

Aktywność enzymatyczną PARS-1 badano z użyciem radioaktywnego substratu [¹⁴C] dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD). Analiza ta wykazała około 70% spadek aktywności enzymu w komórkach APP^{sw}, które charakteryzowała 3,6-krotnie wyższa sekrecja A β w porównaniu do komórek kontrolnych. W komórkach APP^{wt} stwierdzono wzrost poziomu aktywności PARS-1, wynik jest nieznamienisty statystycznie (**rycina 35A**). Obserwowanym zmianom nie towarzyszyły zmiany w poziomie immunoreaktywności białka PARS-1 (**rycina 35B**) oraz ekspresji genu dla tego enzymu (**rycina 35C**).



Rycina 35. Aktywność, immunoreaktywność i poziom ekspresji genu dla PARS-1 w komórkach PC12 charakteryzujących się różnym poziomem sekrecji peptydów A β 1-40

A) Mierzona w homogenacie komórek metodą radiochemiczną aktywność PARS-1 wyrażona w % kontroli. **B)** Badana metodą western blot immunoreaktywność PARS-1 przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem β -aktyny. **C)** Badany metodą Real-time PCR poziom ekspresji genu dla PARS-1 normalizowany względem Gapdh. Wykresy stanowią średnią arytmetyczną z trzech lub czterech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Pod wykresem B zamieszczono przykładowy wyniki western blot. Do oceny statystycznej wyników zasto-

sowano jednoczynnikową analiz wariacji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa.* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli $p < 0,05$

Uzyskane wyniki wskazują, że wywołana uwalnianiem A β śmierć komórek nie jest zaleźna od AIF. Badania sugerują, że podwyźszony poziom AIF w komórkach APPsw moźe brać aktywny udział w utrzymaniu funkcji mitochondriów, wpłuwajc na przeźywalność komórek APPsw, która jest zbliźzona do przeźywalności komórek kontrolnych.

Badanie wpłuwu egzogennych peptydów A β 1-42 na poziom stresu oksydacyjnego, ekspresję genu i poziom białka dla AIF i PARS-1 oraz przeźywalność komórek PC12

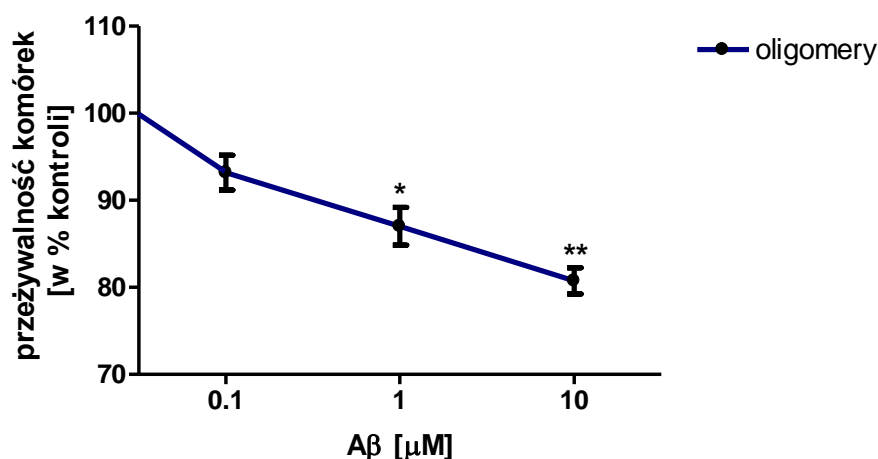
Dalsze doświadczenia dotyczące białka AIF prowadzono *in vitro* na linii komórek PC12 poddanych działaniu egzogennych peptydów A β 1-42.

Analiza przeźywalności komórek PC12 i poziomu białek AIF i PARS-1 w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego egzogennym podaniem peptydów A β 1-42 w formie oligomerów i fibryli

Wpłuw A β 1-42 podanych zewnątrzkomórkowego na funkcje mitochondriów i przeźywalność komórek PC12 badano testem redukcji błękitu tiazolowego, MTT.

W celu znalezienia odpowiedniego stężenia A β analizowano kinetyk zmian przeźywalności komórek PC12 w zakresie stężeń od 0 do 10 μ M. W przypadku oligomerów A β wykazano zaleźny od stężenia spadek przeźywalności komórek odpowiednio o $\pm 12\%$ dla 1 μ M A β i o $\pm 17\%$ w przypadku 10 μ M (**rycina 36**). Przeźywalność komórek PC12 poddanych działaniu fibryli A β 1-42,

nie ulegała znamionym statystycznie zmianom w badanym zakresie stężeń (dane nieprezentowane).

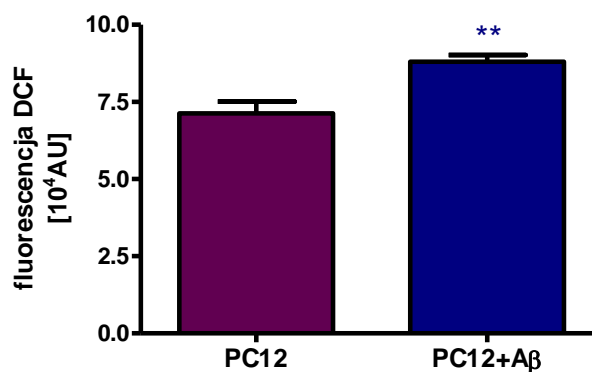


Rycina 36. Zależny od stężenia wpływ oligomerów Aβ 1-42 na przeżywalność komórek PC12

Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT po 24-godzinnej inkubacji z oligomerami Aβ w stężeniach 1-10 μM. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną ± SEM z pięciu niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa. **, p<0,01. *, p<0,05 - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych

Zgodnie z danymi literaturowymi oraz z doświadczeniami własnymi wskazującymi na zależną od stężenia toksyczność oligomerów Aβ, w dalszych doświadczeniach zastosowano Aβ 1-42 w stężeniu 10 μM.

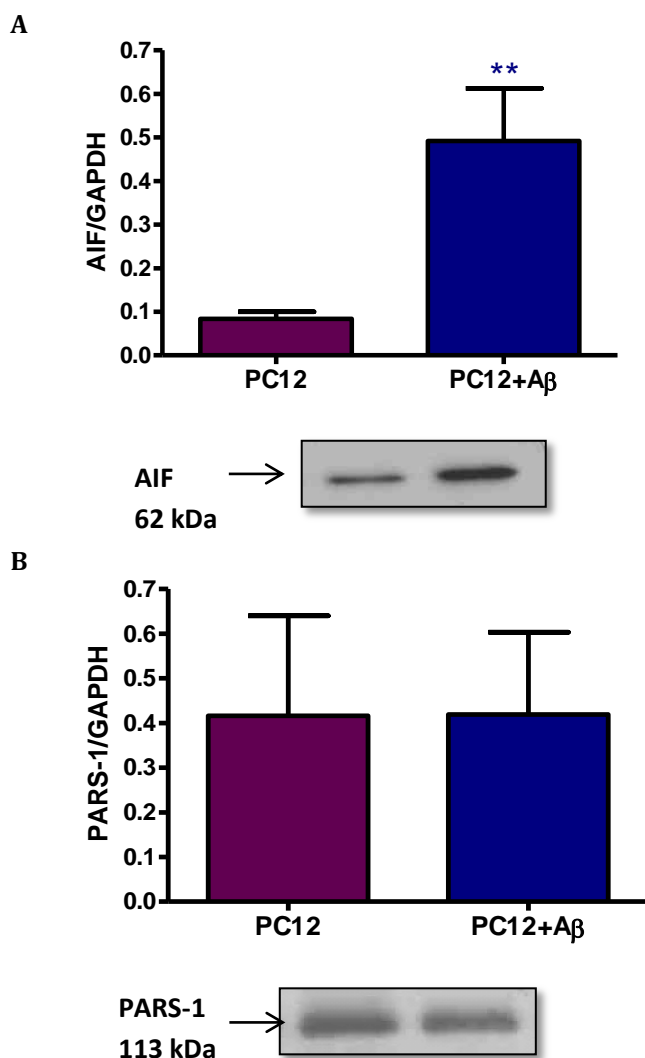
Oceniano poziom stresu oksydacyjnego w komórkach PC12, poddanych działaniu oligomerów Aβ 1-42. Analizę przeprowadzono poprzez pomiar utleniania sondy dichlorodihydrofluoresceiny (H2DCF-DA). Wykazała ona znaczący wzrost poziomu wolnych rodników po zadziałaniu oligomerów Aβ w stężeniu 10 μM (**rycina 37**).



Rycina 37. Wpływ oligomerów A β na poziom wolnych rodników w komórkach PC12

Po 24h hodowli komórek PC12 z oligomerami A β w stężeniu 10 μ M oznaczano poziom wolnych rodników metodą fluorymetryczną z zastosowaniem sondy DCF. Wyniki wyrażono, jako intensywność fluorescencji. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-t. ** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli $p < 0,01$

W celu oceny zaangażowania szlaku sygnalizacyjnego PARS-1/PAR/AIF w mechanizm śmierci komórek PC12 wywołany egzogennymi oligomerami A β , zbadany został poziom immunoreaktywności białek AIF i PARS-1. Analiza western blot wykazała znamienne wzrost immunoreaktywności białka AIF po 24 h działania peptydów (**rycina 38A**). W badanym modelu nie zaobserwowano zmian w immunoreaktywności PARS-1 (**rycina 38B**).



Rycina 38. Wpływ oligomerów A β 1-42 na immunoreaktywność AIF w komórkach PC12

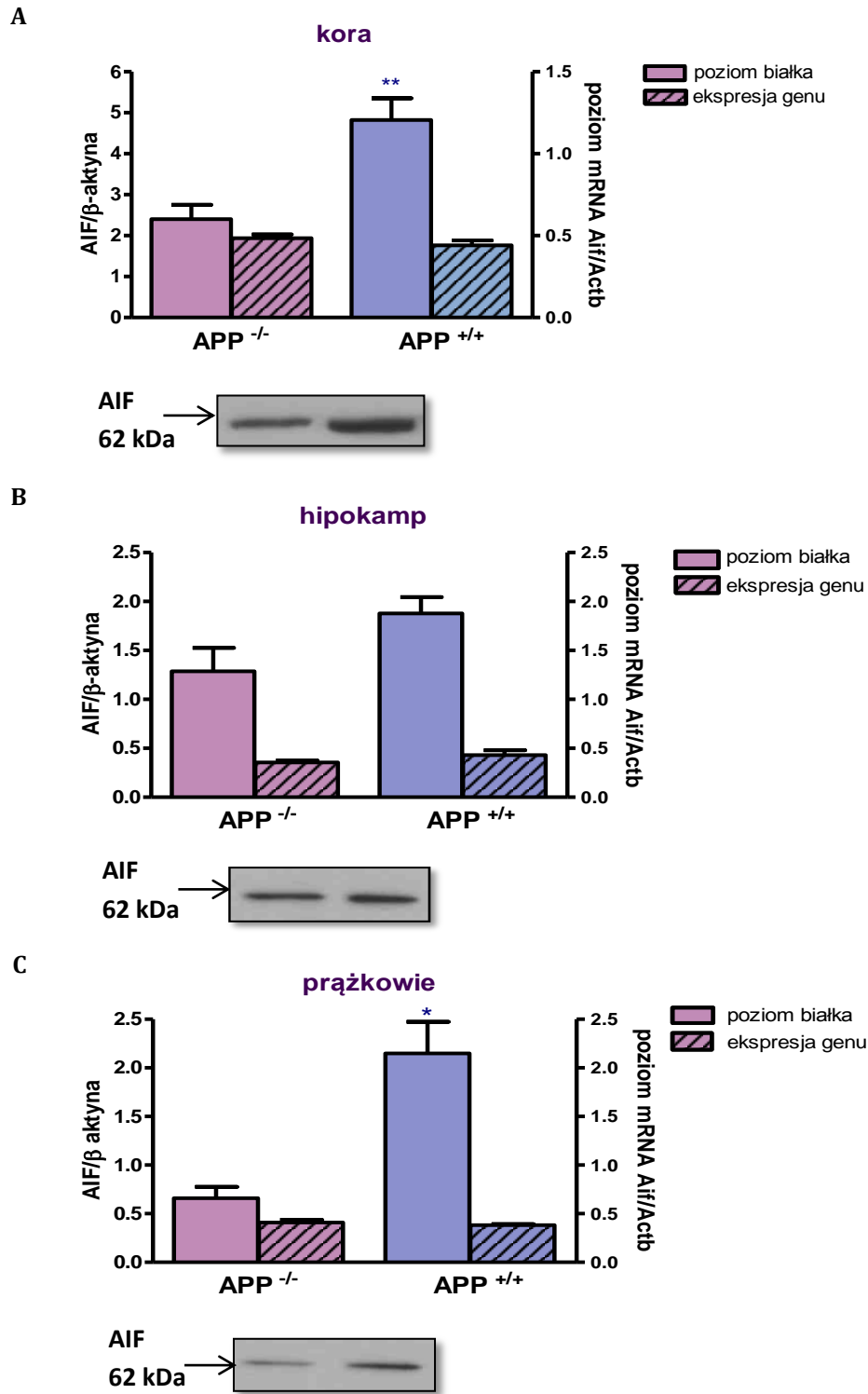
Immunoreaktywność AIF (A) i PARS-1 (B), 24 h po podaniu 10 μ M oligomerów A β 1-42, badano metodą western blot. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH, które stanowią średnią arytmetyczną z pięciu niezależnych doświadczeń \pm SEM. Pod wykresami zamieszczono przykładowe wyniki western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-t. ** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli, $p < 0,01$

Badania ekspresji genu oraz immunoreaktywności białka AIF w różnych częściach mózgu myszy transgeniczných APP^{+/+} z mutacją (Thy1;APP)Val717Ile

Kolejne dořwiadczenia prowadzono na myszach FVBTg(Thy1;APP)Val717Ile, które stanowią jeden ze zwierzęcych modeli rodzinnej postaci choroby Alzheimera.

Zbadano poziom immunoreaktywności i ekspresję genu mitochondrialnego białka AIF. Badania z użyciem metody western blot prowadzono na frakcjach subkomórkowych kory, hipokampa i prążkowie myszy transgenicznych APP^{+/+} z mutacją (Thy1;APP)Val717Ile oraz u myszy kontrolnych FVB (APP^{-/-}). Z poszczególnych części mózgu izolowano RNA w celu oznaczenia ekspresji genów metodą Real-time PCR.

Analiza western blot immunoreaktywności białka AIF we frakcji mitochondrialnej wykazała statystycznie znamienne wzrost poziomu tego białka w korze i w prążkowie myszy APP^{+/+} w porównaniu do myszy kontrolnych (**rycina 39A i 39C**). Poziom immunoreaktywności AIF w hipokampie nie ulegał zmianom statystycznie znaczącym (**rycina 39B**). Analiza poziomu mRNA dla AIF przeprowadzona metodą Real-time PCR wykazała brak zmian w ekspresji genu dla tego białka (**rycina 39**).



Rycina 39. Ekspresja genu i poziom immunoreaktywności AIF u myszy FVB APP^{-/-} i APP^{+/+}

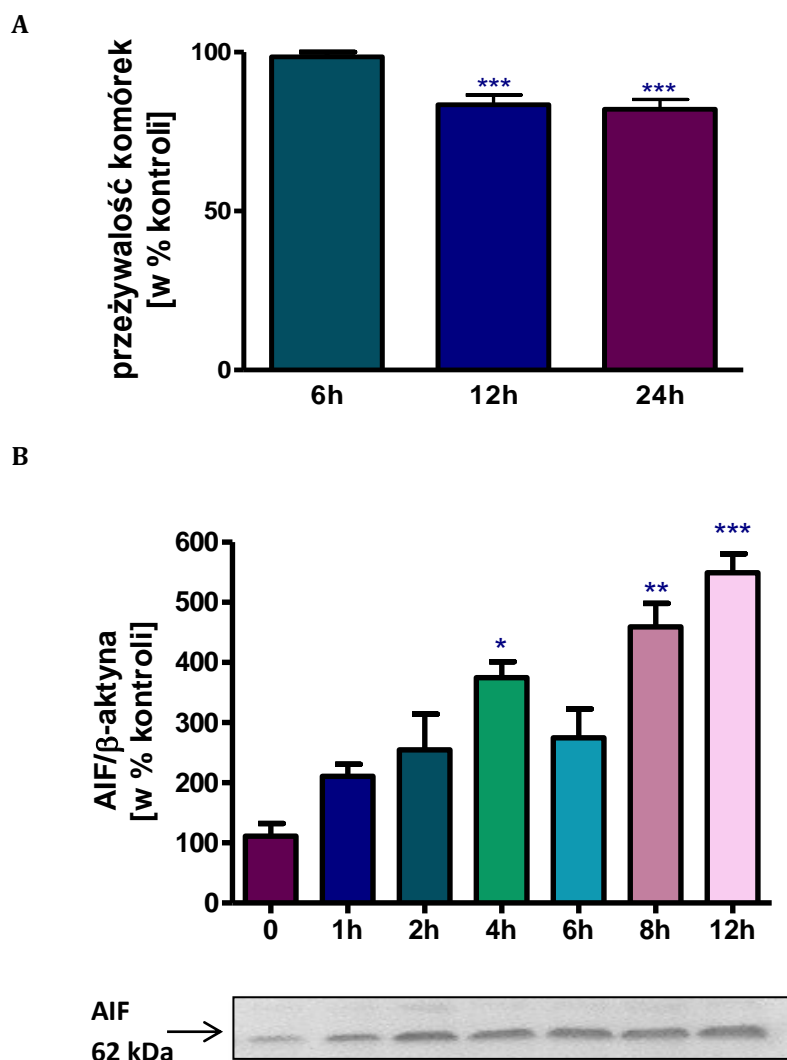
Imunoreaktywność AIF we frakcji mitochondrialnej badana metodą western oraz ekspresja genów badana metodą Real-time PCR (słupki w paski) w korze mózgu (A), hipokampie (B) i prążkowie (C) myszy transgeniczných FVB. Wykresy dla western blot przedstawia wyniki analizy densytometrycznej normalizowanej względem β-aktyny dla Real-time PCR względem genu dla Actb. Wyniki stanowią średnią arytmetyczną z pięciu niezależnych doświadczeń ± SEM. Pod wykresami zamieszczono przykładowe wyniki western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-t. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli

Badanie poziomu i lokalizacji AIF oraz PARS/PAR w stre- sie nitrozacyjnym wywołanym donorem NO w komórkach PC12

Wcześniejsze wyniki badań pokazały, że zwiększone uwalnianie peptydów A β prowadzi do zwiększonego uwalniania NO i wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu w komórce. NO jest słabym wolnym rodnikiem, lecz w wyniku reakcji z rodnikiem ponadtlenkowym tworzy nadtlenoazotyn o właściwościach silnie oksydacyjnych i może prowadzić do aktywacji kaskady wolnorodnikowej, uszkodzenia mitochondriów i programowanej śmierci komórki. W celu lepszego poznania mechanizmów molekularnych wpływających na poziom i lokalizację AIF w wyniku działania peptydów A β , w dalszej części pracy badania prowadzono w warunkach stresu nitrozacyjnego, wywołanego donorem NO, SNP w dwóch stężeniach: 100 i 500 μ M.

Analizę rozpoczęto od zbadania wpływu SNP na przeżywalność komórek PC12. W tych samych warunkach zbadane zostały poziom i lokalizacja AIF.

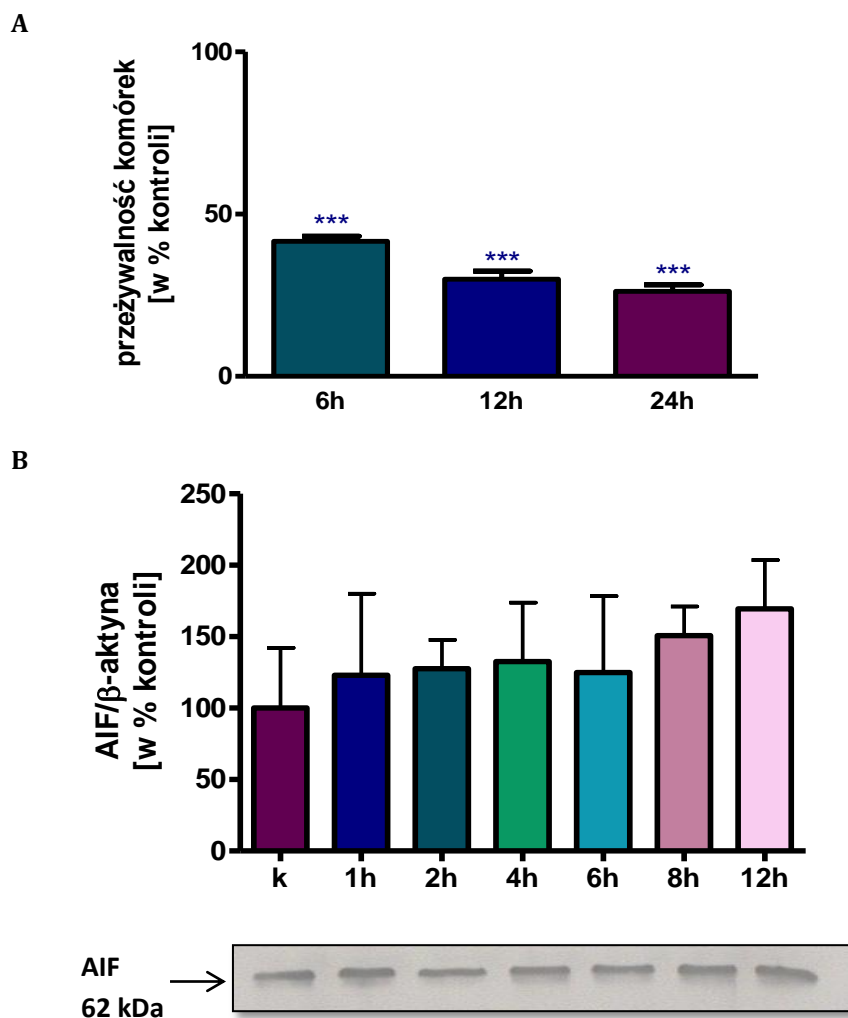
Wyniki testu MTT wykazały zależny od stężenia SNP i czasu jego działania spadek przeżywalności komórek. Po 24h hodowli 100 μ M SNP powodował nieznaczny, około 15-20%, spadek przeżywalności komórek PC12 (**rycina 40A**). W warunkach tych w mitochondriach komórek PC12, zaobserwowano zależny od czasu wzrost immunoreaktywności AIF, który w 12h hodowli osiągał wartość pięciokrotnie wyższą od kontroli (**rycina 40B**).



Rycina 40. Wpływ stresu nitrozacyjnego wywołanego 100 μ M SNP na przeżywalność i poziom immunoreaktywności AIF w komórkach PC12

Komórki PC12 hodowano odpowiednio w czasie 0- 24h w warunkach 2% surowicy z 100 μ M SNP. Wykresy przedstawiają: przeżywalność komórek badaną za pomocą testu MTT (**A**) oraz immunoreaktywność AIF we frakcji mitochondrialnej badaną metodą western blot (**B**). Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Dla wykresu A wyniki stanowią średnią arytmetyczną \pm SEM z ośmiu niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach, natomiast dla wykresu B wyniki przedstawiają analizę densytometryczną normalizowaną względem β -aktyny, która stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Pod wykresem B zamieszczono przykładowy wyniki western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keuls. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli

To samo dořwiadczenie przeprowadzono w warunkach stresu wywołanego 500 μM SNP. Powyższy stres prowadził do drastycznego spadku przeżywalności komórek, który w 24 h doprowadzał do obumierania $\pm 75\%$ komórek (**rycina 41A**). Natomiast analiza western blot nie wykazała zmian w immunoreaktywności AIF w tych warunkach (**rycina 41B**). Do 12 h inkubacji poziom białka nie zmieniał się w pozostałej przy życiu niewielkiej około 25% puli komórek.

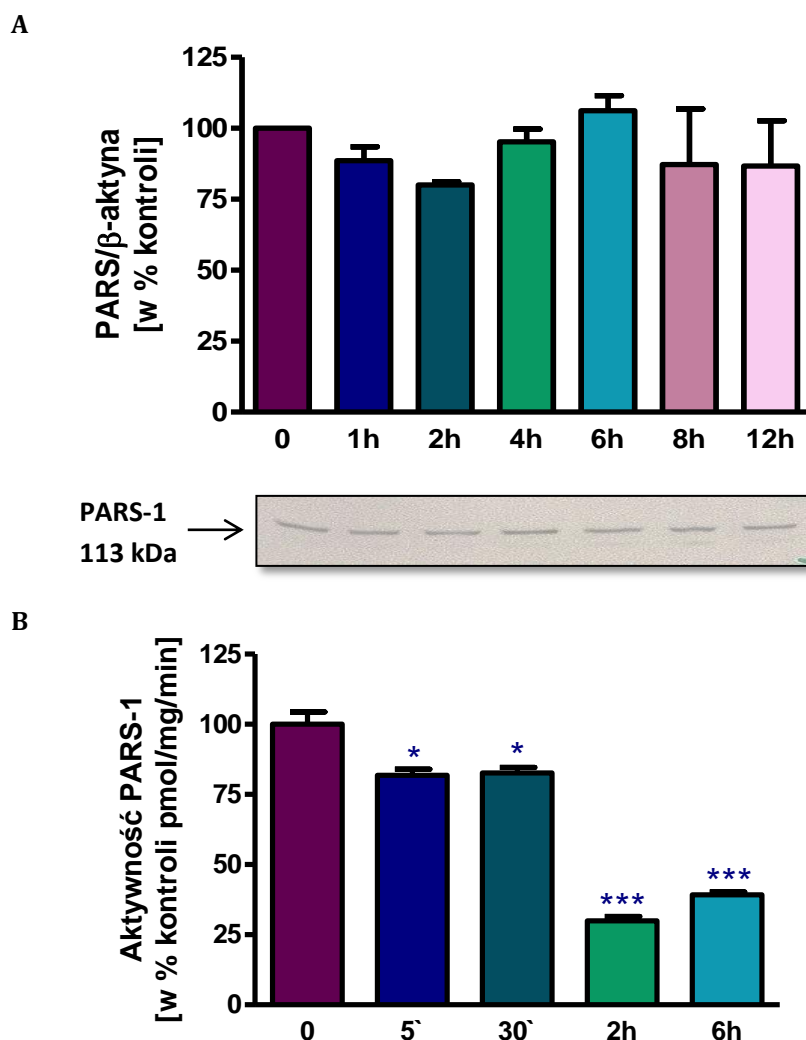


Rycina 41. Wpływ stresu nitrozacyjnego wywołanego 500 μM SNP na przeżywalność i poziom immunoreaktywności AIF w komórkach PC12

Komórki PC12 hodowano odpowiednio w czasie 0- 24h w warunkach 2% surowicy z 500 μM SNP. Wykresy przedstawiają: przeżywalność komórek badaną za pomocą testu MTT (**A**), oraz immunoreaktywność AIF we frakcji mitochondrialnej badaną metodą western blot (**B**). Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Dla wykresu A wyniki stanowią średnią arytmetyczną \pm SEM z ośmiu niezależnych dořwiadczeń w czterech powtórzeniach, natomiast dla wykresu B wyniki przedstawiają analizę densytometryczną normalizowaną względem β -aktyny, która stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych dořwiadczeń \pm SEM. Pod wykresem B zamieszczono przykładowy wyniki western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newman-Keuls. *** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli, $p < 0,001$

W warunkach stresu nitrozacyjnego wywołanego donorem NO ekspresja genu dla AIF nie ulegała zmianie (wyniki nieprezentowane).

W kolejnych doświadczeniach wykazano, że hodowla komórek w obecności 500 μM SNP przez 12h, nie miała wpływu na poziom białka PARS-1 we frakcji jądrowej komórek PC12 (**rycina 42A**). Natomiast aktywność PARS-1, drastycznie spadała. Już po 5 minutach inkubacji jej wartość spadała do $\pm 80\%$ wartości kontrolnej, natomiast po 2h aktywności enzymu wynosiła jedynie $\pm 30\%$ wartości kontrolnej (**rycina 42B**).

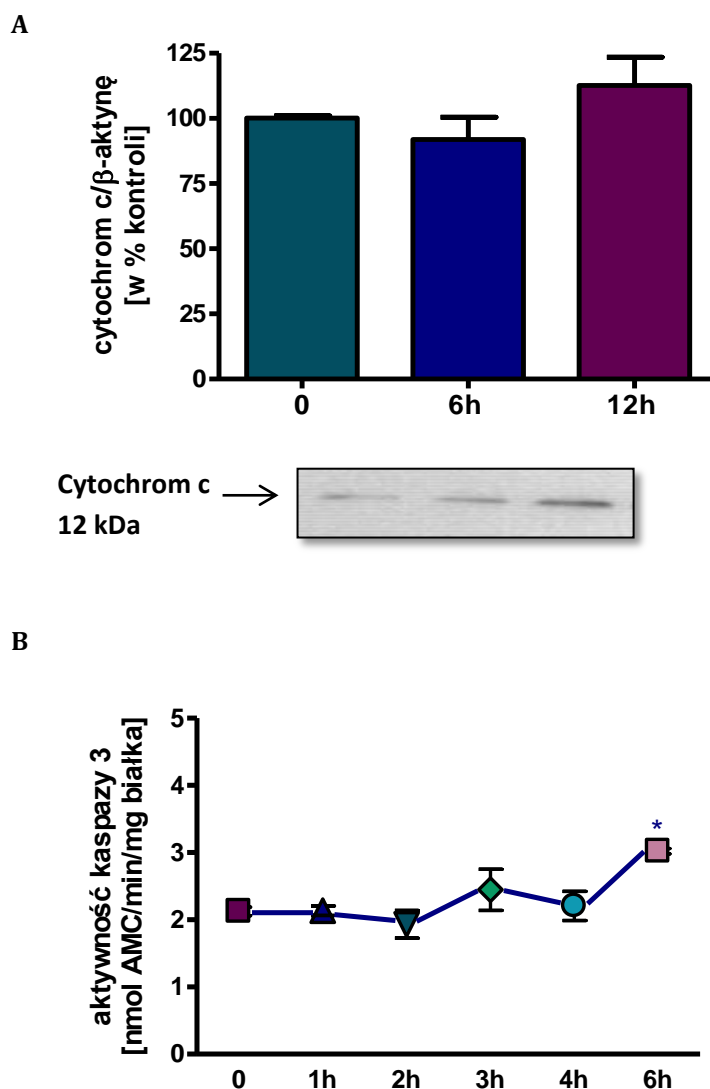


Rycina 42. Wpływ donora tlenu azotu (SNP) na poziom immunoreaktywności i aktywność PARS-1

Wykres **A** przedstawia badaną metodą western blot immunoreaktywność PARS-1 w zgrubnej frakcji jądrowej komórek PC12, hodowanych 0-12 h w obecności 500 μ M SNP. Wyniki analizy densytometrycznej normalizowanej względem β -aktyny stanowią średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Pod wykresem zamieszczono przykładowy wyniki western blot. Wykres **B** przedstawia aktywność PARS-1 mierzoną w homogenacie komórek PC12 po 5', 30', 2h i 6h hodowli z 500 μ M SNP. Wyniki wyrażone w pmol/mg białka/min, w % kontroli, stanowią średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Bonferroni. * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$ - różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli

W powyższych warunkach doświadczalnych zbadano także ekspresję genu dla PARS-1. Wykazano brak wpływu donora NO, w stężeniu 500 μM , na poziom ekspresji tego genu (dane nieprezentowane).

Za śmierć komórek w odpowiedzi na działanie NO uwalnianego z SNP, odpowiedzialne mogą być różne czynniki. Zbadano czy inne proapoptotyczne białka, takie jak kaspaza-3 i cytochrom c, nie są zaangażowane w mechanizm śmierci komórek w powyższych warunkach. Analiza western blot nie wykazała statystycznie znamiennych zmian w poziomie immunoreaktywności cytochromu c po 12h hodowli w mitochondriach komórek PC12 w obecności 500 μM SNP (**rycina 43A**). Dodatkowo w czasie od 0 do 6 h w odpowiedzi na 500 μM SNP zbadano aktywność kaspazy 3 i w 6 h zaobserwowano znamienny wzrost jej aktywności (**rycina 43B**).



Rycina 43. Wpływ stresu oksydacyjnego wywołanego SNP na poziom immunoreaktywności cytochromu c i aktywność kaspazy 3

Badana metodą western blot immunoreaktywność cytochromu c we frakcji mitochondrialnej (**A**) oraz analizowana metodą fluorymetryczną aktywność kaspazy 3 (**B**) komórek PC12, hodowanych w obecności 500 μ M SNP odpowiednio przez 0-12h. Wykres A przedstawia wyniki analizy densytometrycznej normalizowanej względem β -aktyny, która stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Pod wykresem zamieszczono przykładowy wynik western blot. Wykres B stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych doświadczeń w dwóch powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa. * - $p < 0,05$ - różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek PC12 kontrolnych (nietraktowanych)

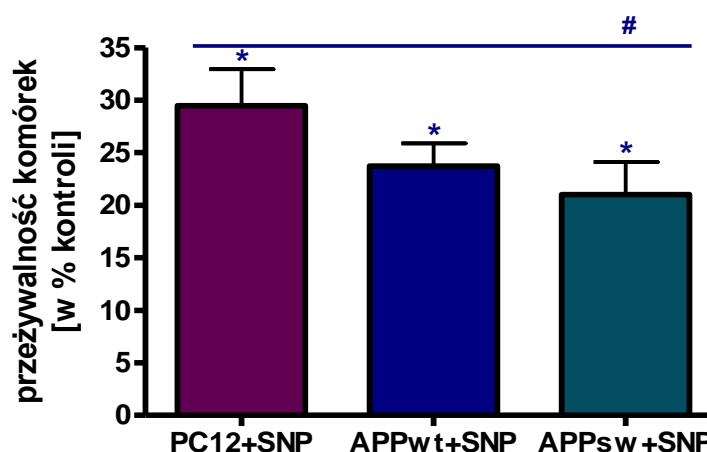
Uzyskane wyniki wskazują, że w warunkach badanego stresu nitrozacyjnego obserwowany wzrost poziomu białka AIF w mitochondriach lub utrzymanie jego poziomu, może warunkować przeżycie większej lub mniejszej puli komórek. Wyniki wykluczają udział białka AIF i czynny udział PARS-1 w śmierci komórek. Aktywność PARS-1 jest silnie hamowana przez NO, a wynik ten może sugerować udział uwalnianego przez A β NO w hamowaniu PARS-1 w komórkach APPsw. Wyniki wskazują na aktywację szlaku zależnego od kaspaz.

Badanie wpływu stresu nitrozacyjnego wywołanego donorem NO w komórkach PC12 transfekowanych genem dla białka APP

Zgodnie z danymi literaturowymi oraz poprzednimi wynikami dotyczącymi zmian zachodzących w komórkach PC12 poddanych transfekcji genem dla białka APP, wykazany został istotny udział NO w toksyczności peptydów A β . Uzyskane przez mnie wyniki potwierdzają wzrost aktywności NOS w stosowanych do badań komórkach transfekowanych białkiem APP. NO uwalniany w nadmiarze może uczestniczyć w kaskadzie wolnorodnikowej i w konsekwencji prowadzić do śmierci komórek. W kolejnych doświadczeniach analizowano wpływ dodatkowego stresu nitrozacyjnego wywołanego donorem NO, SNP na poziom i lokalizację białka AIF oraz na aktywność i integralność PARS-1 w warunkach działania endogennych peptydów A β w trzech liniach komórek: PC12 kontrolnych, APPwt transferowanych dzikim genem dla białka APP oraz genem z mutacją szwedzką APPsw. Badania miały na celu stwierdzenie, czy komórki transfekowane APP wykazują większą wrażliwość na badany stres nitrozacyjny.

Analiza wpływu NO na przeżywalność, ekspresję i poziom białek AIF i PARS-1 w komórkach PC12 transfekowanych genem dla białka APP

Doświadczenia z użyciem testu MTT wykazały, że SNP 500 μ M obniża przeżywalność wszystkich trzech typów komórek do 70-80%. Dodatkowo, komórki APPsw charakteryzuje wyższa wrażliwość na stres wywołany NO w porównaniu do komórek kontrolnych – PC12 (rycina 44).



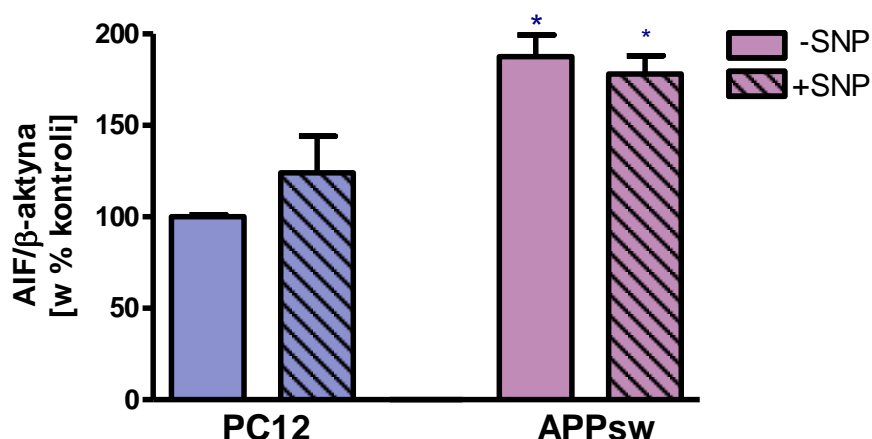
Rycina 44. Wpływ NO uwalnianego przez SNP na przeżywalność komórek transfekowanych genem dla białka APP

Komórki PC12, APPwt i APPsw inkubowano z 500 μ M SNP przez 24h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa. * - różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, $p < 0,05$. # - różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek PC12 poddanych działaniu 500 μ M SNP, $p < 0,05$

Podobnie jak we wcześniejszych doświadczeniach dalsza analiza dotycząca działania zewnątrzkomórkowo uwalnianego NO skupiona została na białkach AIF i PARS-1. Biorąc pod uwagę, że tylko komórki APPsw charakteryzowa-

ła zwiększona wrażliwość na stres wywołany donorem NO, ta linia została wybrana do kolejnych analiz.

Badanie metodą western blot wykazało, że zastosowanie stresora, 500 μ M SNP, nie wpływało na podwyższoną immunoreaktywność białka AIF komórek APPsw spowodowaną działaniem endogennie uwalnianych peptydów A β . Zaobserwowano podobny poziom immunoreaktywności AIF w mitochondriach komórek APPsw traktowanych 500 μ M SNP, w stosunku do kontroli PC12. Natomiast w odniesieniu do nietraktowanych APPsw poziom ten (jak omówiono powyżej), nie ulegał statystycznym zmianom (**rycina 45**).

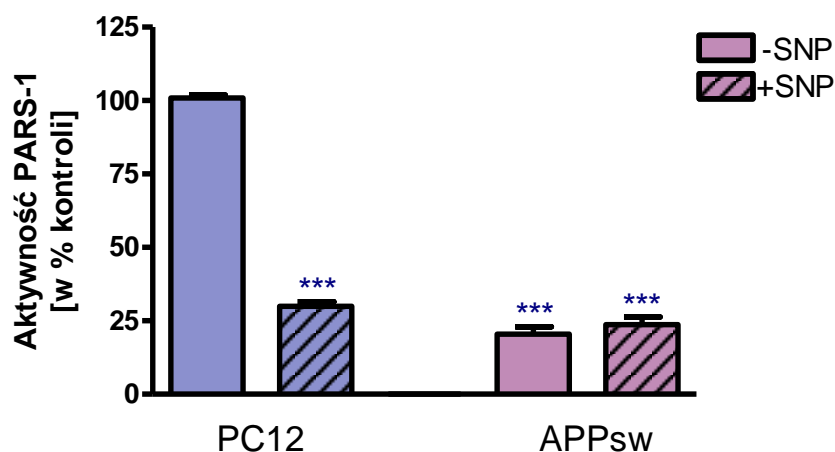


Rycina 45. Wpływ stresu nitrozacyjnego wywołanego SNP na poziom immunoreaktywności AIF w komórkach PC12 transfekowanych genem dla białka APP

Badana metodą western blot immunoreaktywność AIF, we frakcji mitochondrialnej komórek PC12 kontrolnych i APPsw, hodowanych dodatkowo w obecności 500 μ M SNP. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem β -aktyny i stanowi średnią arytmetyczną z trzech lub czterech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa. * - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek PC12 kontrolnych $p < 0,05$

Analiza poziomu aktywności PARS-1 w warunkach stresu nitrozacyjnego wykazała obniżenie aktywności tego enzymu w komórkach PC12 w stosunku do komórek kontrolnych, nietraktowanych SNP. Donor NO, 500 μ M SNP, nie wpły-

wał juź na znacząco obniżoną aktywność enzymatyczną PARS-1 w stosunku do odpowiedniej kontroli APPsw, nietraktowanej SNP (rycina 46).



Rycina 46. Wpływ stresu oksydacyjnego wywołanego SNP na aktywność PARS-1 w komórkach PC12 transfekowanych APP

Aktywność PARS-1 mierzono w homogenacie komórek PC12 i APPsw po 2h hodowli z 500 μ M SNP. Wyniki wyrażone w pmol/mg białka/min są % odpowiednich kontroli, nietraktowanych SNP i stanowią średnią arytmetyczną z 3 niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Bonferroni. *** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych PC12 nietraktowanych SNP, $p < 0,001$

Zastosowane w niniejszej pracy tak wysokie, 500 μ M stężenie SNP, stwarza warunki stresu powodującego masowe obumieranie komórek niezależne od translokacji AIF i aktywności PARS-1. Uzyskane dane wskazują, że zachowany poziom AIF i obniżona znacząco aktywność PARS-1 w puli komórek które przeżyły, może warunkować ich większą odporność na tego typu stres.

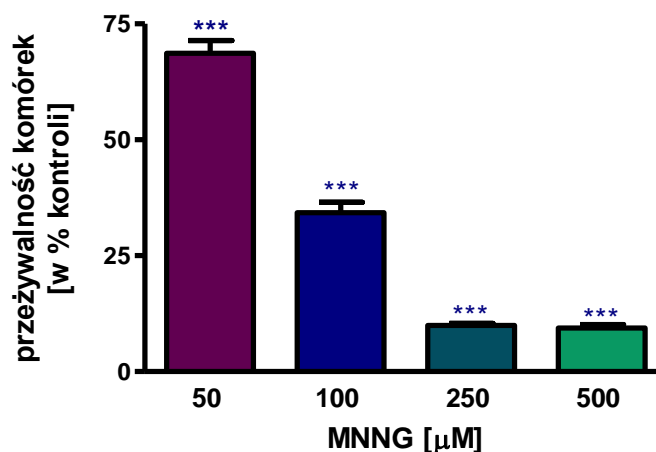
W celu lepszego zrozumienia znaczenia AIF w mechanizmie przeżycia i śmierci komórek dalsze badania prowadzono w warunkach stresu genotoksycznego. Do badań został użyty klasyczny czynnik alkilujący DNA – N-metylo-N-nitro-N-nitrozoguanidyna (MNNG).

Badanie wpływu stresu genotoksycznego na przeżycie komórki HT22, ekspresję i poziom białka AIF i poziom PAR

Wzmożony stres oksydacyjny i genotoksyczny, w zależności od czynnika go wywołującego i od rodzaju komórek, może prowadzić do nadmiernej aktywacji PARS-1, zużycia β NAD⁺ i ATP i w konsekwencji do śmierci komórek, na drodze nekrozy lub apoptozy zależnej, bądź niezależnej od kaspaz.

Wobec powyższego, celem prowadzonych doświadczeń było zbadanie zależności pomiędzy poziomem białka AIF w mitochondriach i poli-ADP-rybozylacją a funkcją mitochondriów i przeżywalnością komórek w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego czynnikiem alkilującym DNA. Jak wiadomo, neurony hipokampa są najbardziej wrażliwe na działanie czynników uszkadzających. Do chwili obecnej tylko nieliczne badania prowadzone były na komórkach neuronalnych. Szeroko rozpowszechnione toksyny obecne w środowisku naturalnym w tym: siarczan metylu, dimetylonitrozoamina, sulfonian etylowy, a także MNNG, mogą doprowadzać do istotnych zaburzeń, do alkilacji DNA i do śmierci. Lepsze zrozumienie mechanizmów obumierania, w tym zbadanie znaczenia AIF/PAR, w neuronach poddanych stresowi genotoksycznemu, może być istotne w neuroprotekcji.

Stres genotoksyczny wpływa na zaburzenie funkcji wszystkich organelli komórkowych, a przede wszystkim mitochondriów i może prowadzić do obumierania komórek. Dlatego też badania rozpoczęto od analizy żywotności komórek w warunkach MNNG, w zakresie stężeń 50 – 500 μ M. Wykazano zależne od stężenia MNNG obumieranie komórek, które w 100 μ M wynosiło \pm 70%, natomiast w najwyższym ze stosowanych stężeń, 500 μ M, obumierało około 85% komórek (**rycina 47**).



Rycina 47. Przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego

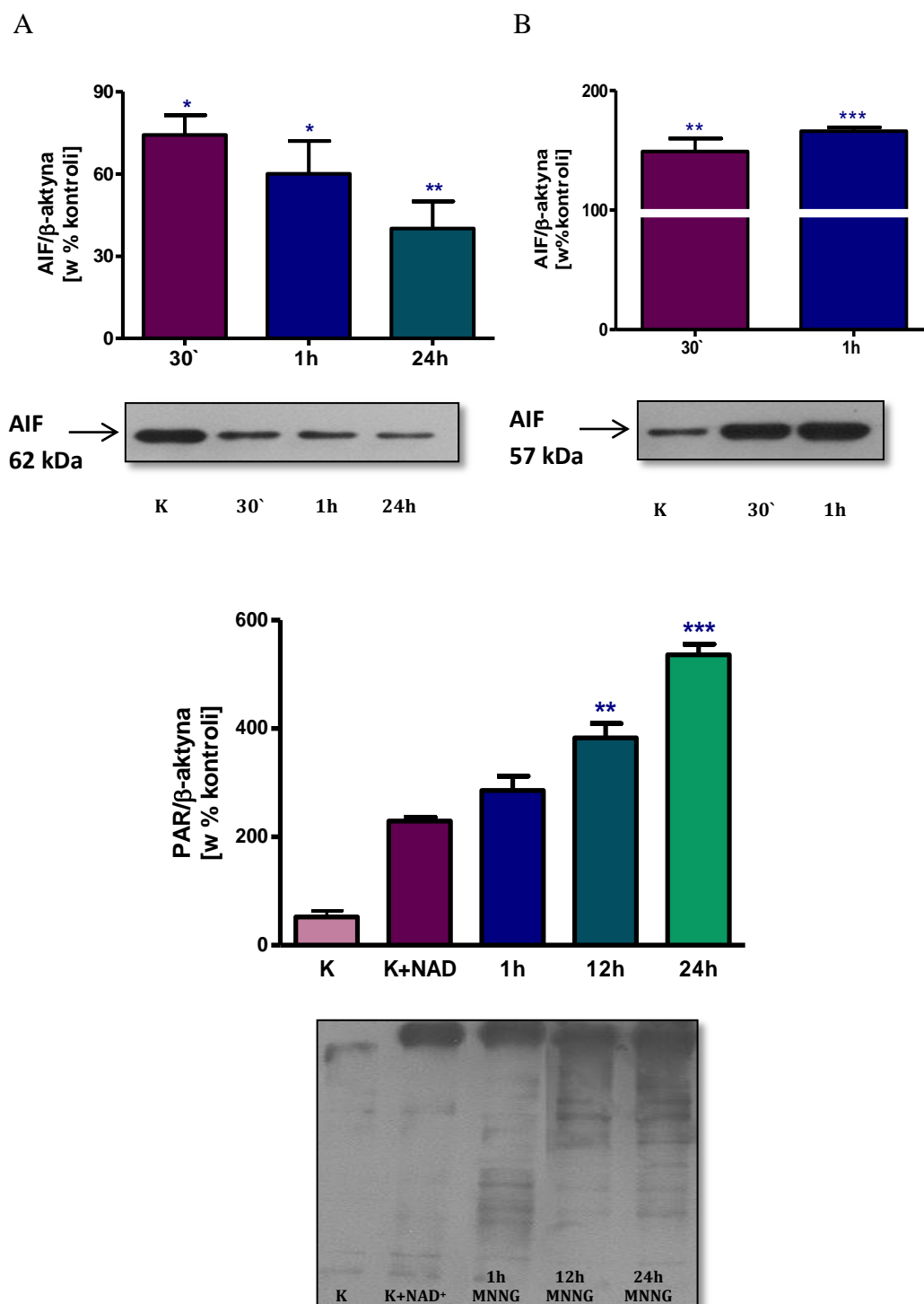
Komórki HT22 inkubowano odpowiednio z 50, 100, 250 i 500 μ M MNNG przez 24 h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keuls. *** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, $p < 0,001$

Prowadzące do śmierci komórki uwalnianie białka AIF może być zależne od nadmiernie zwiększonej aktywności PARS-1. Produktem reakcji enzymatycznej PARS-1 jest poli(ADP-ryboza) PAR, uważana za ważną cząstkę sygnalizacyjną między jądrem a mitochondrium. W kolejnym doświadczeniu w celu poznania mechanizmu, który odpowiedzialny jest za śmierć komórek w stresie genotoksycznym, zbadana została immunoreaktywność AIF oraz kinetyka zmian poziomu immunoreaktywności PAR.

Uzyskane dane pokazały, że inkubacja z MNNG 100 μ M w zależności od czasu sposób, wpływa na obniżenie poziomu immunoreaktywności białka AIF we frakcji mitochondrialnej komórek HT22. Po 24h hodowli komórek z MNNG poziom AIF w mitochondriach osiąga około 45% wartości kontrolnej (**rycina 48A**). Ponadto w warunkach tych obserwowany był wzrost immunoreaktywności AIF we frakcji jądrowej (**rycina 48B**). Wynik ten wskazuje wpływ tego białka z mitochondriów i jego translokację do jądra komórki

Badanie immunoreaktywności PAR metodą western blot, po wcześniejszym przeprowadzeniu reakcji z β NAD⁺, wykazało wyraźnie zwiększoną zdolność do syn-

tezy PAR pod wpływem stresu genotoksycznego i wyraźny wzrost immunoreaktywności PAR, wraz ze wzrostem czasu inkubacji z 100 μ M MNNG. Po 1 h inkubacji poziom PAR wynosił 300% kontroli i wzrastał aż do 500% po 24 h inkubacji (**rycina 48C**). Poziom immunoreaktywności białka PARS-1 nie ulegał zmianie (dane nieprezentowane).

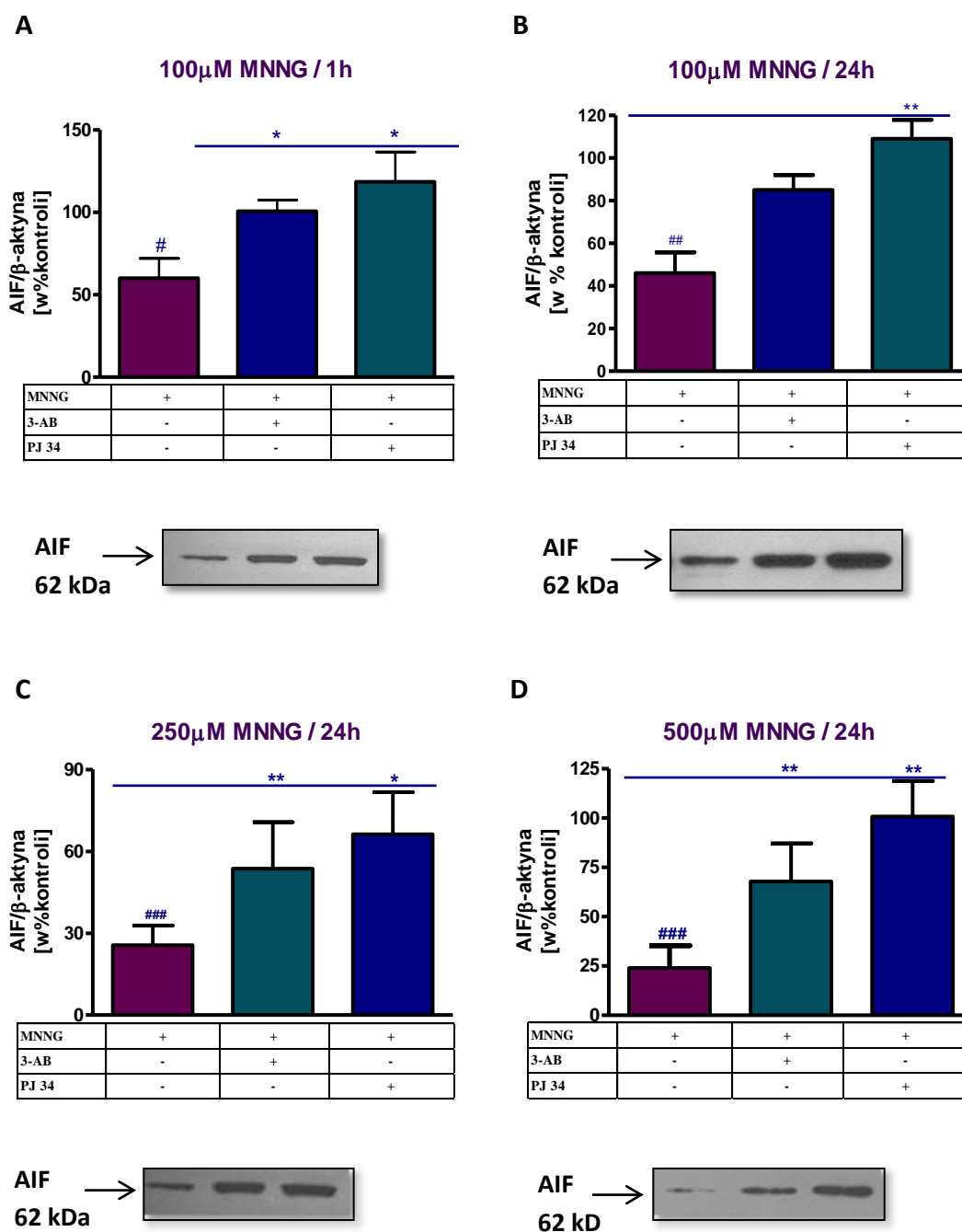


Rycina 48. Wpływ stresu genotoksycznego na immunoreaktywność AIF i PAR

Badana metodą western blot immunoreaktywność AIF we frakcji mitochondrialnej (A) i jądrowej (B) oraz PAR w homogenacie (C) komórek HT22 hodowanych w obecności **100 μM MNNG**, odpowiednio przez 30', 1 h, 12 h i 24 h, a w przypadku PAR dodatkowo po inkubacji z βNAD⁺. Wykresy przedstawiają wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem β-aktyny, która stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń ± SEM. Pod wykresami zamieszczono przykładowe wyniki western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$. Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych

W związku z zaobserwowanym spadkiem poziomu AIF we frakcji mitochondrialnej oraz wzrostem immunoreaktywności PAR w komórkach HT22, zbadano wpływ inhibitorów PARS-1 na poziom AIF w mitochondriach. Do doświadczeń użyte zostały dwa selektywne inhibitory PARS-1, PJ 34 i 3-AB.

Analiza western blot wykazała, że w warunkach stresu genotoksycznego podanie inhibitorów zarówno 20 μM PJ 34, jak i 5 mM 3-AB, znacznie zapobiegało uwalnianiu/obniżeniu poziomu białka AIF we frakcji mitochondrialnej mysich neuronów hipokampa. Obserwacja ta dotyczyła zarówno krótkiej 1h ekspozycji na czynnik stresowy (**rycina 49A**), jak i dłuższej 24 h (**rycina 49B**). Dodatkowo, by sprawdzić czy inhibitory PARS-1 będą wpływały na poziom AIF w odpowiedzi na długotrwały, silny stres genotoksyczny, zastosowane zostały dwa wysokie stężenia MNNG - 250 μM i 500 μM . W obu przypadkach udało się utrzymać wysoki poziom AIF w mitochondriach komórek HT22 po zastosowaniu 3-AB i PJ34 (**rycina 49C i D**).



Rycina 49. Wpływ inhibitorów PARS-1 na immunoreaktywność AIF we frakcji mitochondrialnej w warunkach stresu genotoksycznego

Badana metodą western blot immunoreaktywność AIF we frakcji mitochondrialnej komórek HT22, hodowanych w obecności MNNG, po zastosowaniu inhibitorów PARS-1 (5 μ M 3-AB i 20 μ M PJ34). Wykres **A** przedstawia immunoreaktywność AIF po 1 h inkubacji ze 100 μ M wraz z inhibitorami, wykres **B** po 24h inkubacji ze 100 μ M, **C** po 24h inkubacji ze 250 μ M i **D** po 500 μ M MNNG wraz z inhibitorami PARS-1. Wykresy przedstawiają wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem β -aktyna, która stanowi średnią arytmetyczną z czterech lub pięciu niezależnych doświadczeń \pm SEM. Pod wykresem zamieszczono przykładowe wyniki western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa. ### - $p < 0,001$, ## - $p < 0,01$; # - $p < 0,05$, Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych. ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$, Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MNNG

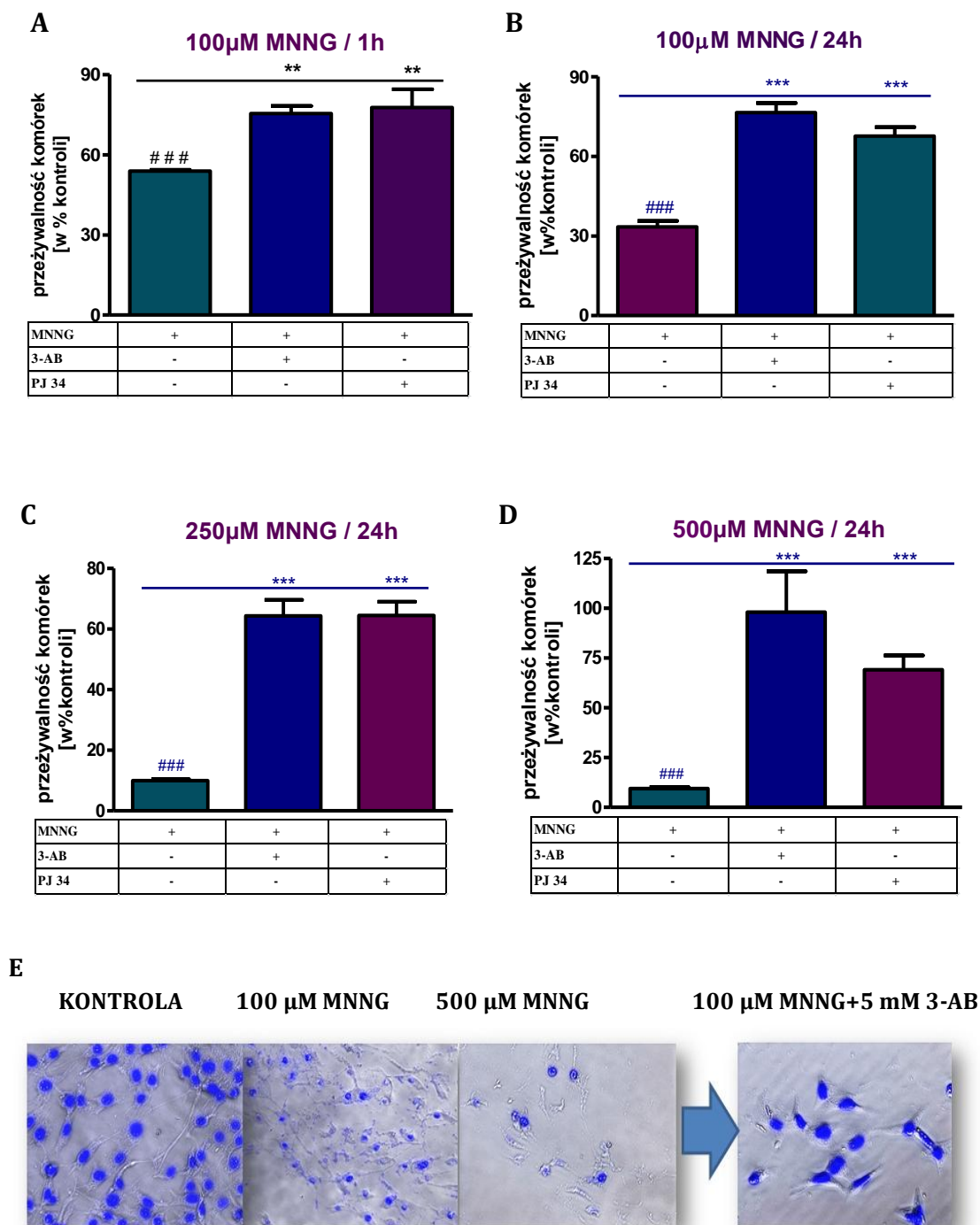
Efekt inhibitorów PARS-1 na przeżywalność komórek poddanych działaniu stresu genotoksycznego

Masywne uszkodzenie DNA prowadzi do nadmiernej aktywacji PARS-1, a w dalszej kolejności wpływa na uwolnienie AIF z mitochondrium i jego translokację do jądra, co skutkuje śmiercią komórki. Stąd też w dalszej kolejności zbadany został wpływ inhibitorów PARS-1 na stopień przeżywalności uniesmiertelnionych neuronów hipokampa.

Badania prowadzono w dwóch różnych czasach inkubacji: 1 h i 24 h działania czynnika genotoksycznego wraz z inhibitorami PARS-1 (3-AB i PJ 34). Przeżywalność komórek ocenianą testem MTT wykonywano po 24h.

Godzina inkubacji komórek HT22 z czynnikiem alkilującym DNA powodowała obumieranie \pm 55% komórek. Podanie inhibitorów PARS-1 (3-AB i PJ34) skutkowało wzrostem przeżywalności o \pm 20% w stosunku do wartości kontrolnej. Oba zastosowane inhibitory wywierały podobny efekt (**rycina 50A**).

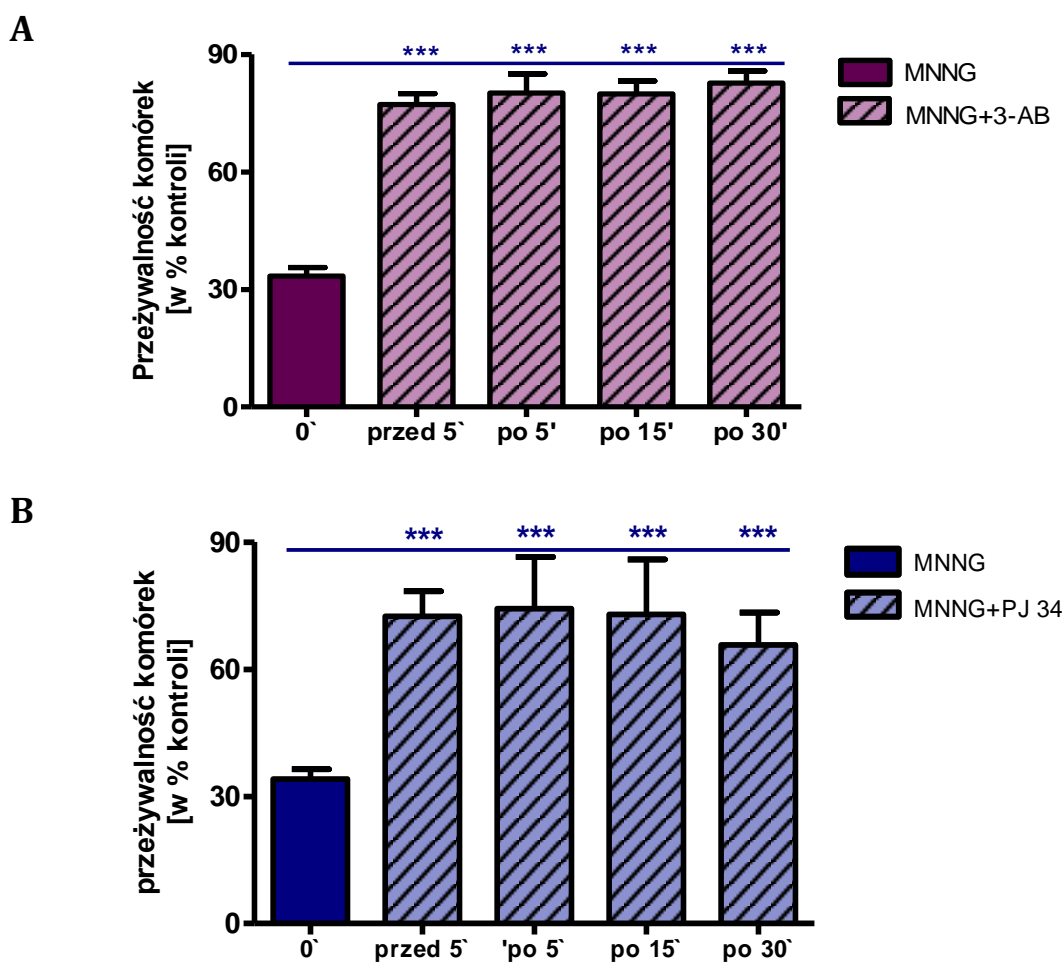
Długotrwałe 24 h działanie MNNG wywoływało masywne obumieranie komórek HT22 (**rycina 50**). W związku z tym zastosowano inhibitory PARS-1 w warunkach 24h inkubacji z MNNG w stężeniach: 100 μ M, 250 μ M i 500 μ M. Badania pokazały, że nawet w warunkach tak mocnego stresu, gdzie w 100 μ M przeżywa około 30% komórek, a w 250 i 500 μ M jedynie około 10% komórek, oba zastosowane inhibitory PARS-1 hamowały śmierć komórek i przeżywało od 60% do 80% w zależności od warunków doświadczalnych (**rycina 50B, C i D**). Zmianom tym towarzyszyły zmiany morfologia komórek (**rycina 50E**).



Rycina 50. Wpływ inhibitorów PARS-1 na przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG

Komórki HT22 poddawane były 5 minutowej preinkubacji odpowiednio z 5 mM 3-AB i 20 µM PJ 34, a następnie traktowane 100 µM przez 1 h (A) oraz 100 µM (B), 250 µM (C) i 500 µM MNNG (D) przez 24 h. Rycina E przykładowe zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające morfologię komórek w wybranych warunkach doświadczalnych. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newman-Keulsa. ###- $p < 0,001$, różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$, różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MNNG

W związku z zaobserwowanym wysoce protekcyjnym działaniem 3-AB i PJ 34 podanych przed stresem, w kolejnym dořwiadczeniu zbadany został wpływ tych inhibitorów po 5, 15 i 30 min od zadziałania czynnika genotoksycznego. Test MTT wykazał wysoką przeżywalność komórek we wszystkich układach dořwiadczalnych, w których komórki poddano działaniu inhibitorów. Podanie 3-AB i PJ 34 po zadziałaniu MNNG nie wpływało na obniżenie ich skuteczności w porównaniu do efektu uzyskanego w wyniku ich zastosowania, przed zadziałaniem stresora (**rycina 51A i B**).

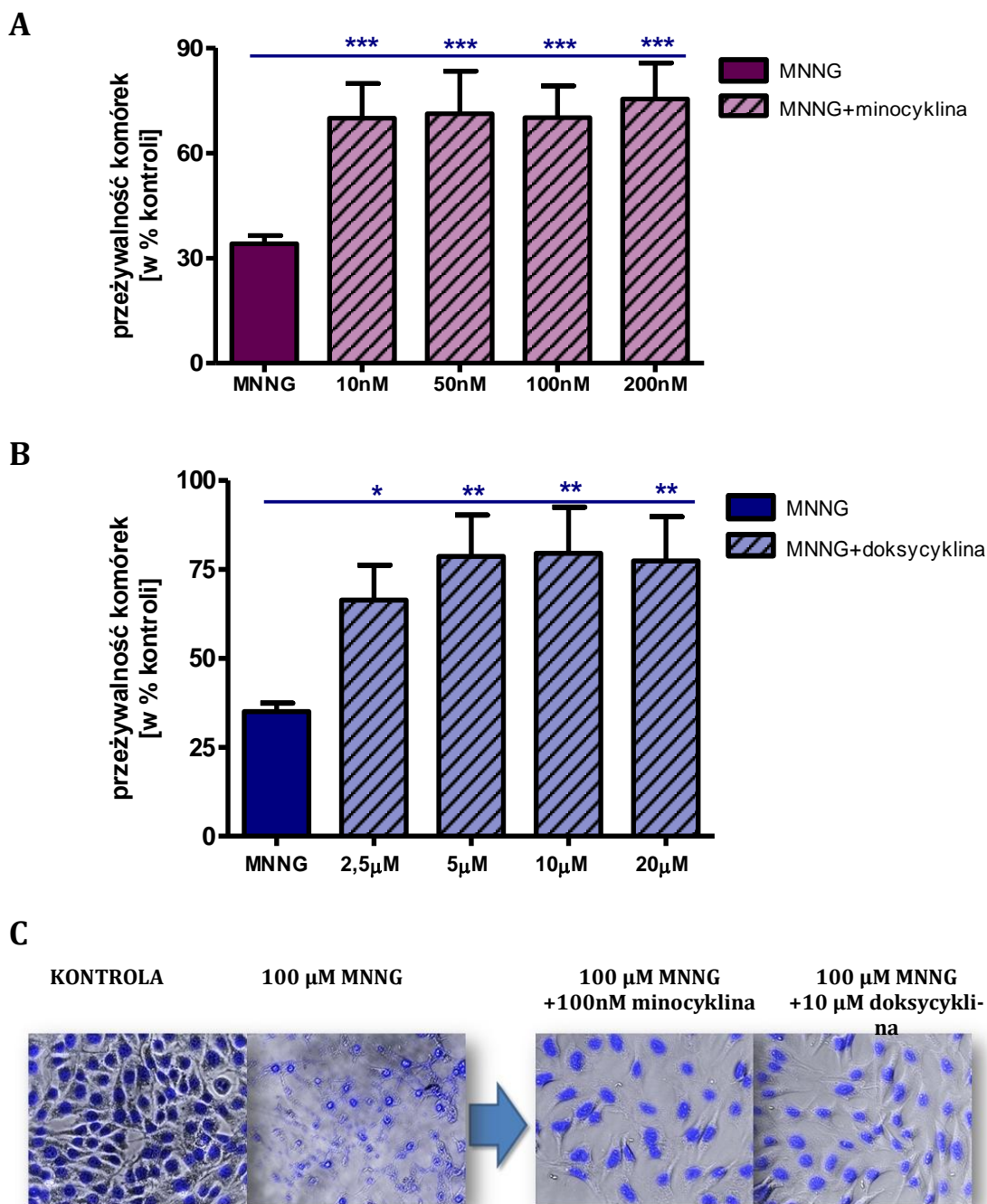


Rycina 51. Wpływ inhibitorów PARS-1 podanych przed i po MNNG na przeżywalność komórek HT22

Komórki HT22 traktowano 100 μ M MNNG, a odpowiednio po 5, 15 i 30 minutach dodawano 5 mM 3-AB (**A**) oraz 20 μ M PJ 34 (**B**) i inkubowano przez kolejne 24h (słupki w paski). Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Každy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z czterech niezależnych dořwiadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newman-Keulsa. *** - $p < 0,001$, różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MNNG

Dotychczas uzyskane wyniki pokazały wyraźne zaangażowanie białek AIF i PARS-1 w mechanizm śmierci badanych komórek, w odpowiedzi na stres wywołany alkilacją DNA, a także wyraźne protekcyjne działanie związków hamujących aktywność PARS-1. Zarówno 3-AB jak i PJ34 charakteryzuje podobieństwo strukturalne. W związku z tym, w dalszej części badań uwaga została skupiona na innych analogach strukturalnych, antybiotykach tetracyklinowych – doksycyklinie i minocyklinie. Oba związki testowane były w zakresie stężeń odpowiednio: 2,5 – 20 μM i 10 – 200 nM.

Oba antybiotyki wykazały protekcyjne działanie w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego przez MNNG. Przeżywalność komórek wzrastała we wszystkich testowanych zakresach stężeń, osiągając około 80% kontroli w przypadku doksycykliny (**rycina 52A**) i niewiele mniej, bo 70% w przypadku minocykliny (**rycina 52B**). Zbadano również morfologię komórek HT22. Zastosowanie antybiotyków miało wyraźne działanie cytoprotekcyjne (**rycina 52C**).



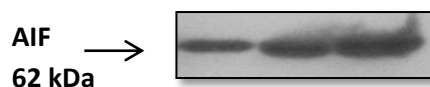
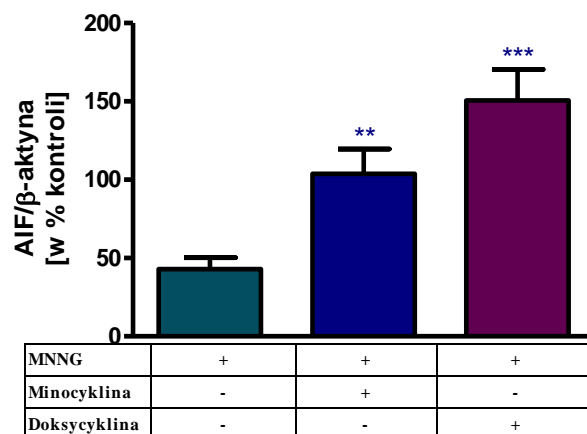
Rycina 52. Wpływ antybiotyków z grupy tetracyklin na przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG

Komórki HT22 poddawane były preinkubacji odpowiednio z doksycyliną 2,5 – 20 μM (A) oraz minocykliną 10 – 200 nM (B), a następnie traktowane 100 μM MNNG przez 24 h. Rycina C przedstawia zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające morfologię komórek w wybranych warunkach doświadczalnych. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newman-Keuls. ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$, różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MNNG

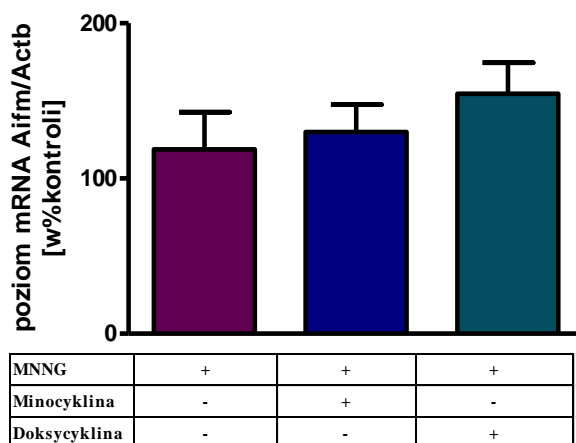
Jak wykazane zostało powyżej, doksycyklina i minocyklina chronią neurony hipokampa przed śmiercią w odpowiedzi na stres genotoksyczny. Stąd też, zbadany został wpływ tych antybiotyków na immunoreaktywność AIF. Badanie pokazało, że podobnie jak i w przypadku inhibitorów PARS-1, oba związki zapobiegają wypływowi AIF z mitochondrium do jądra. 24 h hodowla komórek w warunkach stresu genotoksycznego w obecności 200nM minocykliny powodowała przywróceniem poziomu AIF do wartości kontrolnej, natomiast zastosowanie 10 μ M doksycykliny powodowało wzrost poziomu immunoreaktywności AIF w porównaniu do wartości kontrolnych (**rycina 53 A**).

Dodatkowo zbadana została ekspresja genu dla AIF. W powyższych warunkach doświadczalnych żaden z badanych związków nie miał wpływu na ekspresję tego genu (**rycina 53B**).

A



B

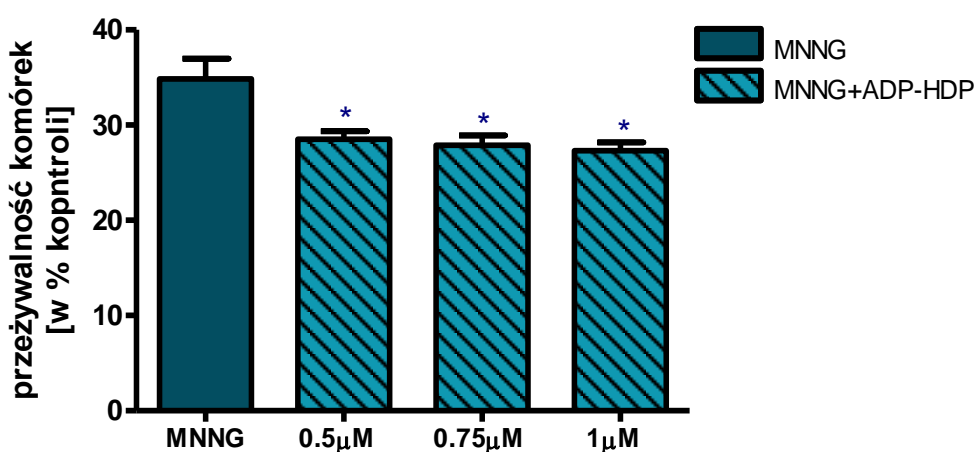


Rycina 53. Wpływ antybiotyków z grupy tetracyklin na poziom immunoreaktywności i ekspresję genu dla AIF w komórkach HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG

Komórki HT22 poddawane były preinkubacji z 10 μ M doksycykliną oraz 200 nM minocykliną, a następnie traktowane 100 μ M MNNG. Badana metodą western blot immunoreaktywność AIF po 24 h hodowli (A) oraz Real-time PCR po 12h hodowli poziom ekspresji jego genu (B). Wykres A przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem β -aktyny, który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Pod wykresem zamieszczono przykładowy wyniki western blot. Wykres B przedstawia poziom ekspresji genu AIF normalizowany względem Actb z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$, różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MNNG

Powyższe dane pokazały istotny udział aktywacji PARS-1 w mechanizmie śmięrci komórek w warunkach stresu genotoksycznego, wywołanego alkilacją DNA. Jednym z najważniejszych enzymów wpływających na utrzymanie równowagi w procesie poli(ADP-rybozyl)acji i poziomu PAR jest PARG. Enzym ten wykazuje aktywność endo i egzoglikohydrolazy i hydrolizuje wiązania między cząsteczkami cukru, utrzymując homeostazę PAR w komórce. Ponadto jego aktywność może również być niezbędna dla prawidłowej naprawy uszkodzeń nici DNA.

W kolejnych doświadczeniach dotyczących wpływu MNNG na przeżywalność komórek HT22 zbadany został także inhibitor PARG – ADP-HDP, w zakresie stężeń od 0,5 do 1 μM . W badanym modelu zahamowanie aktywności PARG wpływało na obniżenie żywotności komórek we wszystkich stosowanych stężeniach (**rycina 54**).



Rycina 54. Wpływ inhibitora PARG na przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG

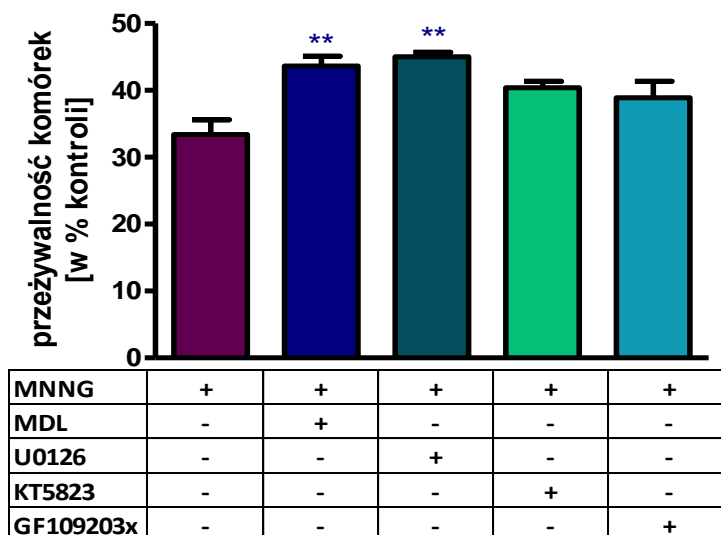
Komórki HT22 poddawane były preinkubacji z ADP-HDP w zakresie stężeń od 0,5 do 1 μM , a następnie traktowane 100 μM MNNG przez 24 h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa. * - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MNNG, $p < 0,05$

Efekt działania potencjalnych związków protekcyjnych na przeżywalność komórek w warunkach stresu genotoksycznego

Dane literaturowe wskazują, że w śmierć komórek na drodze zależnej od PARS-1 zaangażowane są również kinazy białkowe. Mogą one bezpośrednio wpływać na fosforylację PARS-1, a tym samym jego aktywność lub też aktywność PARS-1 i poli(ADP-rybozyl)acja może wpływać na aktywność kinaz. Dlatego też, w kolejnych doświadczeniach w warunkach stresu genotoksycznego i wzmożonej aktywności PARS-1 przebadane zostały inhibitory kinaz białkowych C i G (GF109203x inhibitor PKC i KT5823 inhibitor PKG) oraz inhibitor kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK1/2, U0126).

Uzyskane wyniki wykazały pozytywny wpływ jedynie inhibitora dla ERK1/2, który działał protekcyjnie zwiększając przeżywalność komórek o około 10%. Zahamowanie aktywności pozostałych dwóch kinaz (PKC i PKG) nie miało wpływu na żywotność komórek HT22 (**rycina 55**).

Dodatkowo w powyższych warunkach zbadane zostało także działanie inhibitora kalpajny (MDL28170), białka prawdopodobnie zaangażowanego w proteolityczne cięcie dojrzałej formy AIF, a tym samym za uwalnianie AIF z mitochondrium, umożliwiając translokację tej molekuly do jądra komórki. Przeprowadzone doświadczenie wykazało wzrost przeżywalności komórek po zastosowaniu MDL28170, jednak podobnie jak w przypadku U0126 związek ten zwiększał przeżywalność komórek o około 10-12% (**rycina 55**).

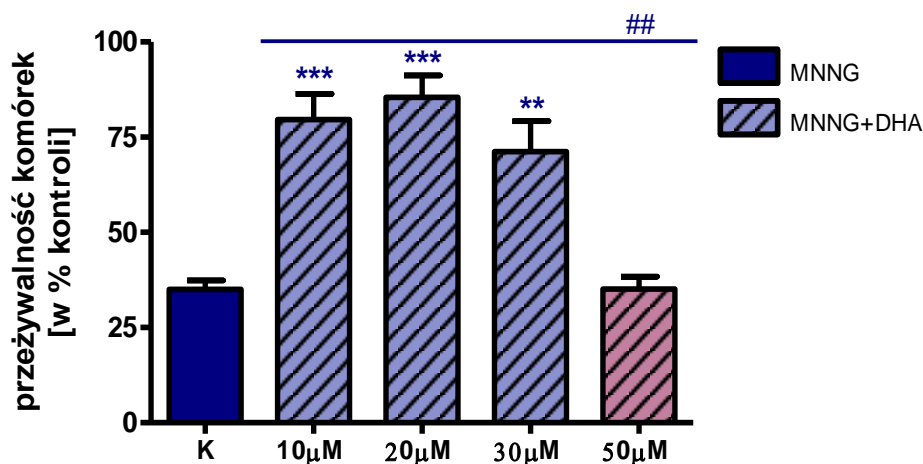


Rycina 55. Wpływ inhibitorów kinaz białkowych oraz kalpajny na przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego

Komórki HT22 poddawane były 5 minutowej preinkubacji z ADP-HDP w zakresie stężeń od 0,5 do 1 μM , a następnie traktowane 100 μM MNNG przez 24h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa. ** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MNNG, $p < 0,01$

Zanalizowano właściwości protekcyjne kwasu dokozaheksaenowego, który wykazuje szereg pozytywnych oddziaływań w organizmie. W doświadczeniach zastosowano kwas DHA w czterech różnych stężeniach: 10, 20, 30 i 50 μM .

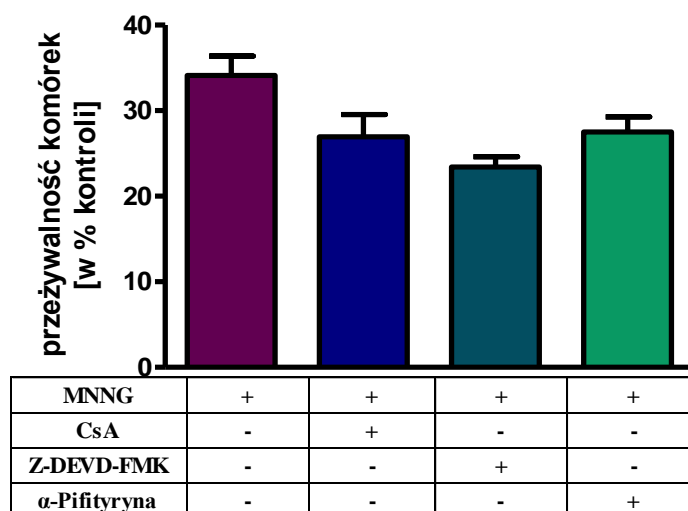
Badania wykazały statystycznie znamienne wzrost żywotności komórek HT22 po zastosowaniu DHA w trzech z wybranych stężeń. Zarówno 10, 20 jak i 30 μM DHA skutkował wzrostem przeżywalności komórek do około 80% wartości kontrolnej. Natomiast w najwyższym ze stosowanych stężeń – 50 μM , odnotowano brak korzystnego wpływu na zależne od MNNG obumieranie komórek. W warunkach tych przeżywało około \pm 35% komórek (**rycina 56**).



Rycina 56. Wpływ DHA na przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG

Komórki HT22 poddawane były 5 minutowej preinkubacji z DHA w zakresie stężeń od 10 do 50 μM , a następnie traktowane 100 μM MNNG przez 24 h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa. *** - $p < 0,001$. ** - $p < 0,01$, różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych traktowanych MNNG. ## - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych 20 μM DHA, $p < 0,01$

Jak wiadomo do śmierci komórki może przyczynić się wiele mechanizmów molekularnych. W celu zbadania czy inne ścieżki sygnalizacyjne prócz tej zależnej od AIF biorą udział w obumieraniu komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego, przetestowane zostały liczne związki o charakterze protekcyjnym: inhibitor mega kanału mitochondrialnego (Cyklosporyna A), inhibitor kaspazy 3 (Z-DEVD-FMK) oraz inhibitor białka p53. Żaden z badanych związków nie wykazał korzystnego wpływu na żywotność komórek w badanych warunkach eksperymentalnych (rycina 57).



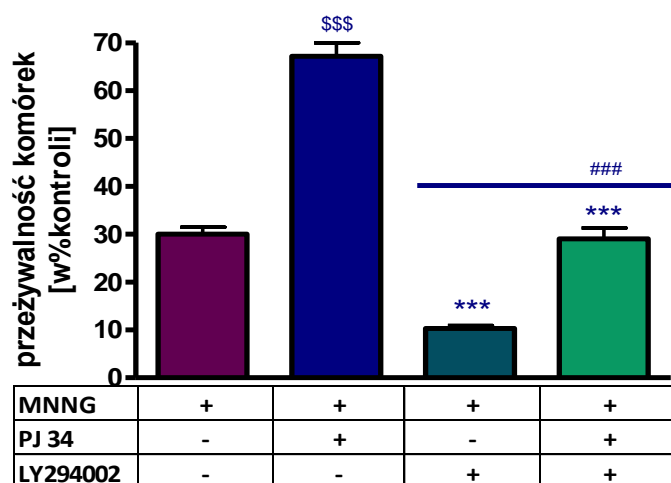
Rycina 57. Wpływ związków o charakterze protekcyjnym na przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG

Komórki HT22 poddawane były 5 minutowej preinkubacji z 2 μ M Cyklosporyną A, 100 μ M Z-DEVD-FMK oraz 20 μ M α -pifityryną, a następnie traktowane 100 μ M MNNG przez 24 h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa

Ścieżka sygnałowa zależna od kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3-K) jest jedną z najważniejszych pro życiowych dróg przekazywania komórkowego. W warunkach długotrwałego stresu genotoksycznego zbadany został wpływ inhibitora PI-3 kinazy, 50 μ M LY-294002 na przeżywalność komórek HT22. Dodatkowo w tych samych warunkach zbadano skuteczność inhibitora PARS-1 (20 μ M PJ34) w zapobieganiu śmierci komórek.

Do określenia żywotności komórek użyto testu MTT, który wykazał, że zahamowanie ścieżki PI3-K wpływa na dodatkowe obniżenie o około 10% przeżywalności komórek w warunkach hodowli w obecności 100 μ M MNNG. Zgodnie z wcześniejszymi wynikami, inhibitory PARS-1 wpływały na poprawę przeżywalności komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego, zahamowanie PI3-K w tych warunkach znosiło ten pozytywny efekt, wskazując, że szlak zależ-

ny od PI3-K odgrywa istotne znaczenie w cytoprotekcyjnym działaniu inhibitorów PARS (rycina 58).



Rycina 58. Wpływ inhibitora PI3-Koraz PARS-1 na przeżywalność komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG

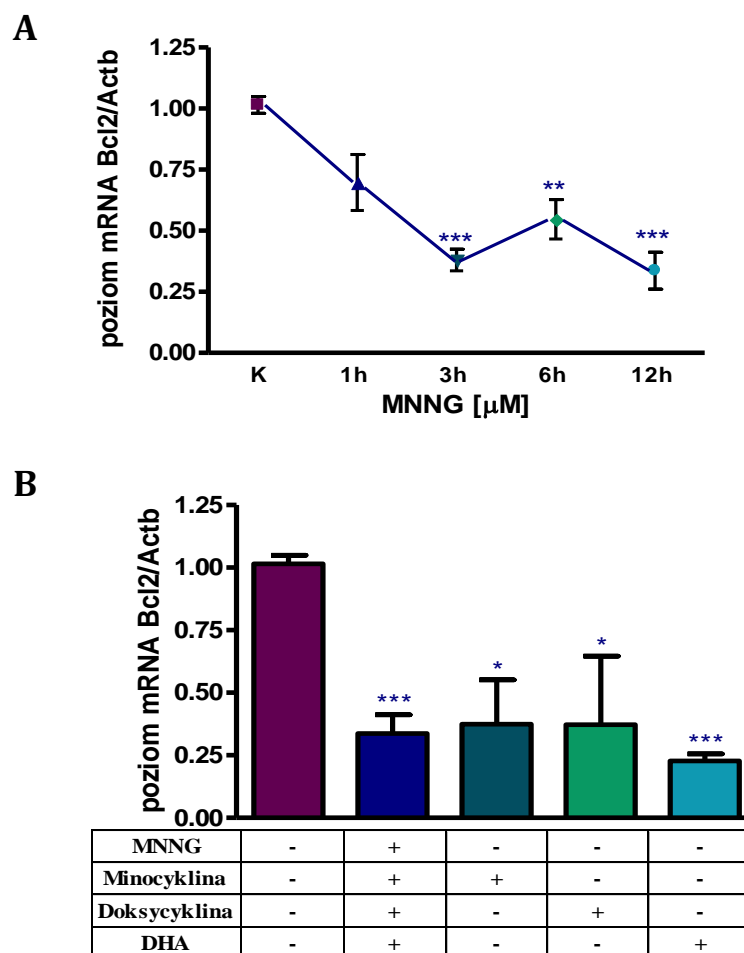
Komórki HT22 poddawane były 5 minutowej preinkubacji z 50 μ M LY294002, a dodatkowo po 5' z 20 μ M PJ 34. Komórki traktowano 100 μ M MNNG przez 24h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa. \$\$\$- Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych traktowanych MNNG $p < 0,001$. *** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MNNG wraz z PJ34, $p < 0,001$. ### - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MNNG wraz z LY294002, $p < 0,001$

Wpływ stresu genotoksycznego na ekspresję genów dla białek pro- i antyapoptotycznych.

Białka z rodziny Bcl-2 odgrywają istotną rolę na szlaku apoptozy i są ważnymi regulatorami uwalniania z mitochondrium białek proapoptotycznych, w tym prawdopodobnie i AIF. W kolejnych doświadczeniach zbadano wpływ MNNG na ekspresję genów dla białek pro- (Bax) i antyapoptotycznych (Bcl-2, Bcl-XL). Zbadana została zarówno kinetyka zmian ekspresji genów w różnym

czasie działania stresora (0-12 h), jak również, ekspresja genów po dodatkowym zadziałaniu związków o charakterze protekcyjnym (mino- i doksycykliny oraz DHA).

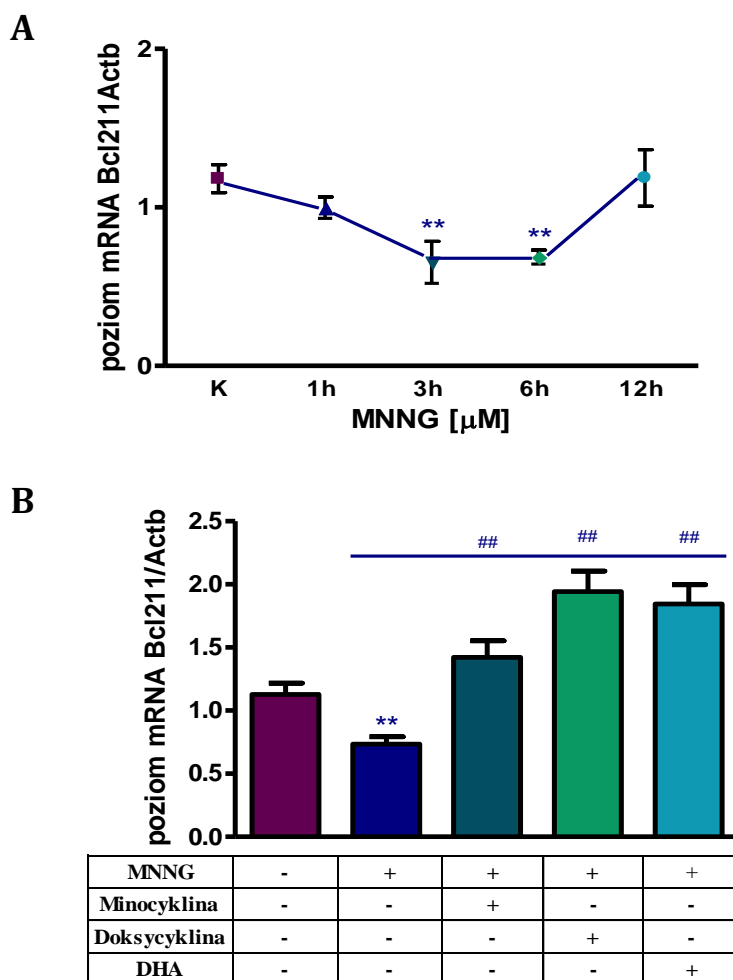
Analiza metodą Real-time PCR wykazała, że w odpowiedzi na MNNG ekspresja genu Bcl2 spadała do około 50% wartości kontrolnej po 3, 6 i 12 h działania stresora (**rycina 59A**). Badania wykazały brak wpływu antybiotyków tetracyklinowych oraz DHA na ekspresję genu dla tego antyapoptotycznego białka (**rycina 59B**).



Rycina 59. Wpływ stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG na poziom ekspresji genu dla Bcl-2 w komórkach HT22

Komórki HT22 traktowane były 100 μM MNNG w czasie od 0 do 12 h (**A**) lub poddawane 5 minutowej preinkubacji z 200 nM minocykliną, 10 μM doksycykliną oraz 20 μM DHA, a następnie traktowane 100 μM MNNG przez 12 h (**B**). Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genu badany metodą Real-time PCR dla białka Bcl-2, a wynik normalizowany jest względem β -aktyny z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$, różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli

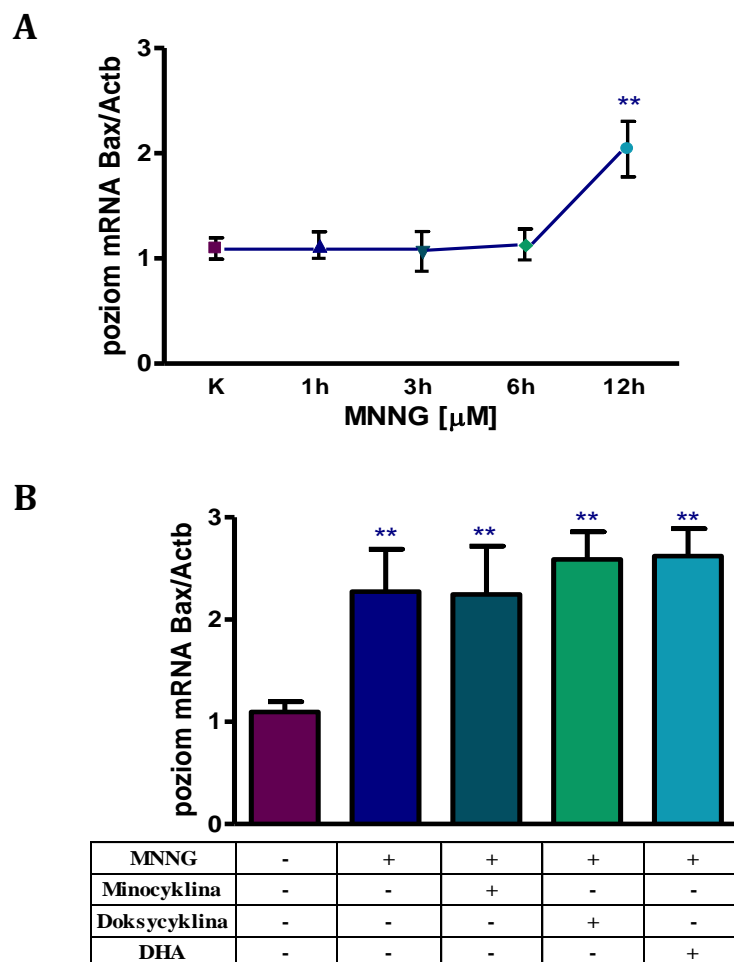
Zbadano również ekspresję Bcl211, genu kodującego białko Bcl-XL. Podobnie jak w przypadku Bcl2, także ekspresja genu dla Bcl-XL spadała w odpowiedzi na stres genotoksyczny wywołany MNNG. Zarówno w 3 jak i w 6 h inkubacji spadek ten był podobny i wynosił około 40% kontroli (**rycina 60A**). Dodatkowo zastosowanie doksycykliny i wielonienasyconego kwasu DHA wpływało na wzrost ekspresji genu dla tego antyapoptotycznego białka (**rycina 60B**).



Rycina 60. Wpływ stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG na poziom ekspresji genu dla Bcl-XL w komórkach HT22

Komórki HT22 traktowane były 100 μM MNNG w czasie od 0 do 12h (A) lub poddawane 5 minutowej preinkubacji z 200 nM minocykliną, 10 μM doksycykliną oraz 20 μM DHA, a następnie traktowane 100 μM MNNG przez 6h (B). Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genu badany metodą Real-time PCR dla białka Bcl-XL, a wynik normalizowany jest względem β -aktyny z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keuls, ** - $p < 0,01$ różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli. ## - $p < 0,01$ -różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych 6 h MNNG

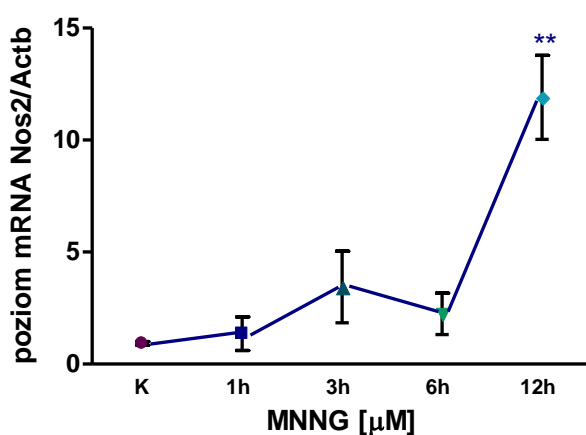
W dalszej kolejności zbadano ekspresję proapoptotycznego białka Bax. Analiza Real-time PCR wykazała wzrost jego ekspresji w odpowiedzi na 12 h inkubację z MNNG (**rycina 61A**). Ekspresja genu dla Bax po zastosowaniu kwasu DHA i antybiotyków tetracyklinowych nie ulegała istotnym zmianom w porównaniu do wartości obserwowanych po samym MNNG (**rycina 61B**).



Rycina 61. Wpływ stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG na poziom ekspresji genu dla Bax w komórkach HT22

Komórki HT22 traktowane były 100 μM MNNG w czasie od 0 do 12 h (**A**) lub poddawane były preinkubacji z 200 nM minocykliną, 10 μM doksycykliną oraz 20 μM DHA, a następnie traktowane 100 μM MNNG przez 12 h (**B**). Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genu badany metodą Real-time PCR dla białka Bax, a wynik normalizowany jest względem β -aktyny z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newman-Keulsa ** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli $p < 0,01$

Dodatkowo po zastosowaniu MNNG zbadana została ekspresja genu dla indukowalnej izoformy syntazy tlenku azotu (iNOS). Obserwowano około 12-krotny wzrost ekspresji tego genu po 12 h inkubacji komórek HT22 ze stresem (rycina 62).



Rycina 62. Wpływ stresu genotoksycznego wywołanego działaniem MNNG na poziom ekspresji genu dla Nos2 w komórkach HT22

Komórki HT22 traktowane były 100 μ M MNNG w czasie od 0 do 12 h. Ekspresję genu NOS2 badano metodą Real-time PCR i normalizowoo względem β -aktyny. Wynik z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newmana-Keulsa ** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli, $p < 0,01$

Dyskusja

Badania prezentowane w tej pracy wykazały zróżnicowane zmiany w poziomie mitochondrialnego białka AIF, w zależności od charakteru stresu oksydacyjnego/genotoksycznego, czasu jego działania, jak również czynników go wywołujących. Stres oksydacyjny towarzyszy większości chorób neurologicznych. Uważany jest za istotny czynnik w patogenezie i patomechanizmie choroby Alzheimera i Parkinsona. Pomimo intensywnych badań, dokładny mechanizm prowadzący do stresu oksydacyjnego w tych schorzeniach nie jest dokładnie wyjaśniony. Ponadto nie są w pełni poznane zjawiska molekularne i szlaki obumierania komórek spowodowane aktywacją stresu oksydacyjnego i genotoksycznego. W wyniku działania wolnych rodników i uszkodzenia makromolekuł dochodzi do zaburzeń funkcji mitochondriów i funkcji enzymów naprawy DNA. Prowadzi to do aktywacji szlaków śmierci komórki. Poznanie mechanizmów warunkujących przeżycie lub doprowadzających do śmierci jest istotne w odniesieniu do nowych neuroprotektoryjnych i neurogeneracyjnych działań. Zaburzenia funkcji mitochondriów są kluczowymi zjawiskami związanymi z patomechanizmem wielu chorób neurodegeneracyjnych. Jednym z głównych białek zaangażowanych w prawidłową funkcję mitochondriów jest czynnik indukujący apoptozę AIF. Ta flawoproteina związana jest z przestrzenią międzybłonową mitochondriów i charakteryzuje się swoistą podwójną naturą. Dwie pierwsze domeny AIF odpowiedzialne są za jego prożyciową, oksydoredukcyjną funkcję (Miramar i wsp., 2001; Otera i wsp., 2005; Vashen i wsp., 2004; Modjtahedi i wsp., 2006; Hangen i wsp., 2009). Natomiast domena C-końcowa odpowiedzialna jest za właściwości proapoptotyczne tego białka (Hong i wsp., 2004; Krantic i wsp., 2007; Hangen i wsp., 2010; Bajt i wsp., 2011).

U podstaw jednej z hipotez patomechanizmu choroby Alzheimera leżą nieprawidłowe przemiany białka prekursorowego amyloidu β (APP) prowadzące do powstania β amyloidu ($A\beta$). Oligomeryzacja i akumulacja $A\beta$ zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz komórki, inicjuje kaskadę zdarzeń prowadzącą do neurodegeneracji. W celu zbadania mechanizmów choroby Alzheimera oraz działania związków farmakologicznie czynnych w tej chorobie wprowadzono

wiele modeli eksperymentalnych zarówno zwierzęcych jak i komórkowych. Jeden z nich stanowią myszy transgeniczne FVBTg z wprowadzonym genem dla APP zawierającym mutację londyńską (Thy1;APP)^{Val717Ile}. Model ten charakteryzuje zwiększony poziom A β 1-42 i zaburzony stosunek A β 1-42/A β 1-40, a także obecność wielu typowych objawów i cech choroby Alzheimera. Gromadzące się złoże A β powodują uszkodzenie mitochondriów oraz uwalnianie wolnych rodników (Moechars i wsp., 1999). W związku z tym na zakończenie serii badań na komórkach PC12 w wybranym modelu doświadczalnym zbadana została immunoreaktywność białka AIF i poziom ekspresji jego genu w różnych strukturach mózgu w zwierzęcym modelu choroby Alzheimera (AD) u myszy transgenicznych APP^{+/+}. Zaobserwowano wzrost poziomu AIF we frakcji mitochondrialnej wszystkich badanych strukturach mózgu w porównaniu do myszy kontrolnych APP^{-/-}. Analiza Real-time PCR nie wykazała zmian w poziomie ekspresji genu dla Aifm.

Podobny wynik uzyskano na dwóch komórkowych modelach stresu oksydacyjnego. Doświadczenia prowadzono na komórkach PC12 transfekowanych ludzkim genem białka APP z podwójną mutacją szwedzką (APP^{sw}), które to charakteryzują się prawie 4 krotnie wyższym poziomem sekrecji peptydów A β w porównaniu do komórek kontrolnych PC12 oraz w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogenego peptydu A β 1-42. W warunkach tych dochodziło do wzrostu immunoreaktywności białka AIF we frakcji mitochondrialnej, a wzrostowi temu nie towarzyszyły zmiany w ekspresji genu Aifm.

Biorąc pod uwagę fakt, że oprócz apoptotycznej roli, AIF ma istotne znaczenie dla prawidłowej funkcji mitochondriów, wydaje się, że wzrost jego poziomu może mieć właściwości protekcyjno-adaptacyjne. Statystycznie znamienny wzrost AIF może chronić komórki przed stresem oksydacyjnym. Doświadczenia Klein i wsp. (2002 i 2003) wskazały na właściwości antyoksydacyjne tego białka. W badaniach prowadzonych na myszach Hq, obniżony poziom AIF skutkowałam zwiększonym poziomem stresu oksydacyjnego u tych zwierząt, a także zwiększoną wrażliwością na uszkodzenia oksydacyjne. Podobne wyniki uzyskane zostały w badaniach na komórkach nowotworowych, gdzie obniżenie poziomu AIF prowadziło do obniżenia poziomu reaktywnych form tlenu

(Urbano i wsp., 2005; Apostořowa i wsp., 2006; Norberg i wsp., 2010). Interesujace zmiany poziomu AIF uzyskane zostały w badaniach na homogenatach kory mózgu osób starych i chorych na Alzheimera, a takżę w szczurzym modelu starzenia. W badaniach tych zaobserwowano wzrost poziomu AIF wszystkich izoform w korze osób starych, a takżę u zwierząt starych w porównaniu do osobników młodych, zdrowych. W badaniach na homogenacie z hipokampa nie zaobserwowano znamiennych zmian w poziomie AIF. Dodatkowo wykazano spadek ekspresji genu dla AIF u osób chorych na Alzheimera w porównaniu z osobami zdrowymi w tym samym wieku. Badacze ci stwierdzili, że deregulacja poziomu AIF w fizjologicznym starzeniu jest prawdopodobnie zwiazana z rolą antyoksydacyjną białka i ma znaczenie protekcyjno-adaptacyjne w celu kompensacji stałego wzrostu poziomu stresu oksydacyjnego obserwowanego w starzeniu (Reix i wsp., 2006). Ponadto wzrost poziomu AIF może wspomagać integrację i prawidłową funkcję kompleksu I i prawdopodobnie III. Badania prowadzone przez Yu i wsp. (2010) na autopsyjnych mózgach pacjentów z AD wykazały wzrost poziomu AIF w hipokampie i korze śródwęchowej. Jednakże w badanych strukturach stwierdzony został takżę wzrost poziomu AIF we frakcji jądrowej, co wskazuje na udział tego białka w śmierci neuronów w patomechanizmie tej choroby. Powyższe różnice mogą być spowodowane czasem trwania choroby, jak również różnicą w nasileniu licznych procesów prowadzących do śmierci neuronów.

Doświadczzenia prowadzone na rekombinowanym białku AIF, któremu brak było pierwszych 120 aminokwasów wykazały, że w warunkach fizjologicznych posiada on waścicości oksydoreduktazy NADH (Miramar i wsp., 2001; Churbanova i Sevrioukova, 2008; Hangen i wsp., 2010). Obniżenie poziomu ekspresji AIF skutkowało zaburzeniem fosforylacji oksydacyjnej i stabilnościci kompleksu I mitochondriów (Vashen i wsp., 2004; Modjtahedi i wsp., 2006; Benit i wsp., 2008). Dodatkowo wykazane zostało, że AIF posiada wysoką homologię strukturalną z reduktazą glutationową, znaną dobrze jako jeden z głównych elementów obronnych przed H₂O₂ w systemie obrony glutationowej. Sugeruje to, że obniżony poziom AIF u zwierząt Hq wpyływa na zwiększenie poziomu stresu oksydacyjnego przez bezpořednią lub pořrednią regulację poziomu H₂O₂ (Klein i Acerman, 2003).

Funkcja adaptacyjna/protekcynna AIF widoczna jest szczególnie w przypadku komórek PC12 transfekowanych ludzkim genem dla białka APP z mutacją szwedzką (APP_{sw}). Mimo zmian spowodowanych nadmiernym nagromadzeniem i uwalnianiem peptydów A β oraz zmian ultrastruktury mitochondriów i innych zaburzeń wewnątrzkomórkowych, komórki te przeżywają. Jak wiadomo, uwalniany i podlegający oligomeryzacji A β może wpływać na zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu. Po przeprowadzeniu analizy poziomu wolnych rodników w wyżej wymienionych trzech liniach komórkowych, stwierdzono istotny ich wzrost, zbliżony w komórkach APP_{sw} do wartości obserwowanych w komórkach APP_{wt}. Istnieje możliwość, że podwyższony poziom AIF w tych komórkach zapobiega nadmiernej aktywacji stresu oksydacyjnego. W teście MTT, który obrazuje poziom przeżywalności komórek po 24 h hodowli, nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ich przeżywalności w stosunku do komórek kontrolnych PC12.

Analizowano aktywność i integralność jądrowego enzymu polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARS-1), jednego z najczulszych wskaźników stresu oksydacyjnego, który jest enzymem krytycznym dla wielu patologicznych i patofizjologicznych przemian (Strosznajder i wsp., 2003, 2005, 2010; Beneke i Burkle, 2007; Moroni, 2008; AbdElmageed i wsp., 2011; Moroni i wsp., 2011). W warunkach zwiększonego uwalniania peptydów A β w komórkach APP_{sw} dochodziło do znaczącego obniżenia aktywności enzymatycznej PARS-1, przy braku zmian w poziomie immunoreaktywności oraz ekspresji tego białka. Obniżona aktywność PARS-1, przy zachowanej jego integralności, wyklucza udział tego enzymu w mechanizmie śmierci zależnej od kaspazy-3 i od AIF w zaprezentowanych warunkach doświadczalnych (w 24 h hodowli komórek w 2% surowicy). Natomiast znamienne obniżona aktywność PARS-1 może mieć istotne znaczenie w zaburzeniu procesów naprawy DNA. Z drugiej strony, obniżenie aktywności PARS-1 może ratować komórki przed kryzysem energetycznym, zużyciem β NAD⁺ i ATP, jaki mogłaby spowodować nadmierna jego aktywacja. W konsekwencji pozwala to na przeżycie komórek. Znaczące obniżenie aktywności PARS-1 w komórkach APP_{sw} może być także związane z udziałem uwalnianego przez A β NO i z automodyfikacją enzymu. Wyniki badań Sidorkina i wsp. (2003) wykazały, że NO może wpływać na hamowanie PARS-1 przez

modyfikacje palców cynkowych tego białka. Zaprezentowane w niniejszej rozprawie badania z donorem NO, SNP i wcześniej opublikowane (Pytlowany i wsp., 2008) wskazały również na istotne znaczenie NO w hamowaniu aktywności PARS-1. Ponadto wiadomo, że PARS-1 jest najlepszym dla siebie substratem, istnieje więc duże prawdopodobieństwo, że w wyniku działania nadmiernego stresu ulega on autorybozylacji, co prowadzi do zahamowania jego aktywności (Ueda i Hayashi, 1982). Obserwowany nieznamienny wzrost aktywności PARS-1 w komórkach APPwt może być wyrazem zaangażowania tego enzymu w proces naprawy DNA.

Powyższe dane mogą wskazywać, że wraz z licznymi procesami degeneracyjnymi zachodzącymi w komórkach transfekowanych białkiem APP, mają miejsce zjawiska o charakterze protekcyjno-adaptacyjnym, które pozwalają tym komórkom na przeżycie w warunkach zwiększonego uwalniania peptydów A β i wzmożonego stresu oksydacyjnego. Wydaje się prawdopodobne, że podobne zmiany mogą mieć miejsce w przebiegu choroby Alzheimera. W autopsyjnych badaniach mózgow osób ze sporadyczną postacią choroby stwierdzono zwiększoną ADP-rybozylację i nagromadzenie poli(ADP-rybozy) (Love i wsp., 1999). Ostatnie wyniki, jak omówiono wcześniej, przedstawiają zmiany w poziomie AIF w hipokampie i korze śródwęchowej i wskazują na translokację pewnej puli tego białka do jądra komórki (Yu i wsp., 2010).

W celu lepszego zrozumienia znaczenia AIF i PARS-1/PAR w mechanizmie przeżycia i śmierci komórek, badania zostały przeprowadzone w warunkach dodatkowego stresu oksydacyjnego/nitrozacyjnego. Badania post mortem mózgow osób z chorobami neurodegeneracyjnymi wykazały obecność nitrowanych białek, których powstawanie jest wynikiem działania ONOO \cdot i NO (Nakamura i Lipton, 2010, 2011a, b). Udokumentowane zostało, że zarówno NO, jak i ONOO \cdot mogą hamować aktywność poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego w mitochondriach, prowadząc do zaburzenia równowagi energetycznej komórki (Ebadi i Sharma, 2003; Nakamura i Lipton, 2010, 2011). Zmiany te prowadzą do aktywacji kaskady wolnorodnikowej, uszkodzenia i fragmentacji mitochondriów, fragmentacji DNA i śmierci komórki. W niniejszej pracy

doświadczenia prowadzono na komórkach PC12 po zastosowaniu donora NO, nitroprusydku sodu (SNP).

Wyniki wcześniejszych badań Strosznajder i wsp. (2000) oraz Keil wsp. (2004a, b) pokazały, że neurotoksyczny fragment A β oraz zwiększone uwalnianie peptydów A β prowadzi do wzrostu aktywności NOS, a w konsekwencji do zwiększonego uwalniania NO. Związek ten charakteryzuje się niską reaktywnością, jednak w obecności anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-) prowadzi do wytworzenia nadtlenoazotynu ($ONOO^-$) (Koppenol i wsp., 1992), który jest bardzo silnym utleniaczem. Może on modyfikować nie tylko białka, ale również powodować oksydację lipidów, białek oraz kwasów nukleinowych, o czym była już mowa we wstępie (Kilbourn i wsp., 2000).

Zastosowanie donora NO w stężeniu 100 μ M, prowadziło do spadku przeżywalności komórek (\pm 18%). W warunkach tych poziom AIF we frakcji mitochondrialnej wzrastał czterokrotnie, co prawdopodobnie skutkowało przeżyciem znacznej puli komórek. Natomiast przy zastosowaniu wyższego stężenia SNP 500 μ M, obserwowano drastyczny spadek przeżywalności komórek - po 24 h hodowli przeżywało tylko 25% komórek, w których poziom AIF nie ulegał zmianie. Dodatkowo publikowane wcześniej wyniki badań wykazały, zależną od działania NO aktywację cyklooksygenaz i lipoksygenaz. W warunkach tych inhibitory tych enzymów chroniły istotną pulę komórek przed śmiercią (Pytlowany i wsp., 2008; Strosznajder i wsp., 2011).

Prezentowane wyniki pozostają w zgodzie z danymi uzyskanymi na chondrocytach. Zależna od NO programowana śmierć tych komórek nie była związana z translokacją AIF, tylko z aktywacją szlaku apoptozy zależnej od kaspaz (Kuhn i Lotz, 2003). Podobne obserwacje wykazały badania Suka i wsp. (2002), gdzie za zależną od NO apoptozę astrocytów również odpowiedzialna była kaskada kaspaz. Badania Yung i wsp. (2004) zaprezentowały, że NO prowadzi do kaspazo-niezależnej śmierci astrocytów, w której główną rolę odgrywają: białko p53 i BAX. Powyższe wyniki pozostają jednak w sprzeczności z danymi uzyskanymi przez Cheunga i wsp. (2006). Prowadzone przez nich badania na zmutowanych neuronach korowych, w których to AIF nie posiadał właściwości wpływu z mitochondriów i translokacji do jądra komórki wykazały, że

zastosowanie inhibitora topoizomerazy (kamptotecyny) poprawiało przeżywalność komórek w stosunku do komórek prawidłowych.

Dane uzyskane przez Kawasaki i wsp. (2007) w doświadczeniach prowadzonych na komórkach glejowych wykazały, że NO uwalniany z SNP wpływał na translokację AIF do jądra komórek. Badacze ci sugerowali istotne znaczenie szlaku MAP kinaz w tym procesie. Wszystkie powyższe dane pokazują, że skutki jakie niesie za sobą działanie NO, jest komórkowo specyficzne i dodatkowo zależy od stężenia użytego stresora, a także prawdopodobnie od wielu nie do końca poznanych czynników.

W opisanych badaniach własnych obserwowany wzrost poziomu białka AIF może być związany z procesem modyfikacji posttranslacyjnej, jednak mechanizm tego zjawiska nie jest poznany. Druga hipoteza wzrostu poziomu tego białka może wskazywać na zmiany/zaburzenia procesów jego degradacji. Jednak i o tym mechanizmie niewiele jest wiadomo.

W wymienionych wyżej warunkach doświadczalnych zbadany został poziom ekspresji genu dla Aifm. Pomimo różnic w poziomie białka, w żadnym z przypadków nie zaobserwowano zmian w ekspresji jego genu. Prawdopodobnie fakt ten związany jest z tym, że jest to białko wysoce konserwowane ewolucyjnie (Brown i wsp., 2006) i niezbędne dla prawidłowej funkcji mitochondriów (Klein i wsp., 2002). Badania prowadzone przez Browna i wsp. (2006) na ssaczych zarodkach z użyciem Aif^{flox} (Aif z przerwaniem 7 egzonem przez miejsce loxP i wskutek tego delecją nukleotydów 694-778 oraz przerwaniem ramki odczytu) wykazały, że AIF jest niezbędne dla wczesnej embriogenezy i przeżycia neuronów. Doświadczenia, w których dokonano delecji genu dla AIF w mózdku i śródmózgowiu wykazały, że białko to było potrzebne dla komórkowo-specyficznej neurogenezy w rozwijającym się mózgu (Ishimura i wsp., 2008).

W warunkach zastosowanego stresu nitrozacyjnego przeprowadzona została analiza poziomu białka i aktywności jądrowego enzymu PARS-1. Donor NO, SNP, wpływał na drastyczne obniżenie aktywności enzymatycznej PARS-1, bez znaczących zmian w poziomie białka. Długa, 48h inkubacja komórek HT22 z donorem NO skutkowała jednakże obniżeniem poziomu białka PARS-1

w wyniku degradacji przez zaktywowaną w tych warunkach kaspazę-3 (Adamczyk i wsp., 2010). Wydaje się, że również w naszych badaniach obserwowany niewielki ale znamieny wzrost kaspazy-3 po dłuższym czasie działania stresu oksydacyjnego mogłoby powodować obniżenie aktywności PARS-1 i jego degradację. Wcześniejsze dane pokazują, że NO poprzez aktywację kaskady wolnorodnikowej i uszkodzenie DNA może stymulować PARS i prowadzić do nadmiernej aktywacji tego enzymu, a w konsekwencji do obumierania komórek w wyniku wyczerpania ATP (Zhang i wsp., 1994). Badania Zhiyuana i wsp. (2006) wykazały, że nadmiar powstającego w komórkach NO może bezpośrednio przyczynić się do S-nitrozyłowania PARS-1, a przez to do hamowania aktywności tego enzymu. Dodatkowo wydaje się, że ta modyfikacja może stanowić negatywne sprzężenie zwrotne. Znane jest również zjawisko przejściowej aktywacji, a następnie inhibicji PARS-1, które może być obserwowane w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem peptydów A β lub jonów żelaza II w komórkach PC12 lub na frakcję jądrową uzyskiwaną z hipokampa mózgu szczura (Strosznajder i Banasik, 2000; Strosznajder i wsp., 2005).

W niniejszej pracy wykazano, że komórki transfekowane APP z mutacją szwedzką są bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny wywołany za pomocą donora NO, SNP, niż komórki kontrolne. Jednak dodatkowy czynnik stresowy nie wpływał już ani na wyższy poziom AIF, ani też na obniżoną aktywność PARS-1 w tych komórkach. Wynik ten może wskazywać, że wymienione zjawiska w komórkach APPsw zostały maksymalnie zmienione przez endogennie uwalniane peptydy A β i nie są w stanie odpowiedzieć na dodatkowe czynniki stresowe.

Mimo że AIF wydaje się chronić pewne komórki w ciągu ich życia, posiada on również dobrze zbadane właściwości proapoptotyczne (Porter i wsp., 2006; Hangen i wsp., 2010). W badaniach na neuronach hipokampa w warunkach obniżonego poziomu tlenu i glukozy, obniżenie poziomu AIF przy zastosowaniu iRNA chroniło komórki przed obumieraniem (Culmsee i wsp., 2005). Wiadome jest, że w odpowiedzi na różne warunki stresowe aktywne kalpainy i katepsyny odcinają AIF od wewnętrznej błony mitochondrialnej. Białko to przemieszcza się do jądra komórki i w kompleksie białkowym z endonukleazą

G, prowadzi do kondensacji chromatyny i jej specyficznego cięcia na charakterystyczne 50 kbp fragmenty (Susin i wsp., 1999).

W prowadzonych przez nas badaniach nad rolą AIF w przeżyciu i śmierci komórek, zastosowano stres genotoksyczny. Związki chemiczne bardzo licznie występujące w środowisku, a także niektóre leki używane m.in. w onkologii, wpływają na uszkodzenie DNA przez jego alkilację, co może być przyczyną mutacji, degeneracji i śmierci komórek. Stąd też badania dotyczące genotoksyczności są szeroko rozpowszechnione, a molekularne działania związków genotoksycznych występujących w środowisku pozostają wciąż nie w pełni wyjaśnione. W celu lepszego poznania mechanizmów molekularnych śmierci komórek w wyniku alkilacji DNA, w badaniach używa się klasyczne, występujące również w środowisku, czynniki uszkadzające DNA: sulfonian etylu (MMS), metylonitrozourea (MNU) i N-metyl-N-nitro-N-nitrozoguanidyna (MNNG). Wpływają one na alkilację DNA przez dodanie grupy metylowej do miejsc nukleofilowych w zasadach azotowych DNA, a w przypadku MNNG jest to duża liczba adduktów O-metyl guaniny (Wyatt i Pittman, 2006). W stężeniach nM MNNG powoduje obumieranie komórek, a mechanizm śmierci nie jest wyjaśniony. Wiadomo, że uszkodzenia DNA aktywują kluczowy dla naprawy DNA enzym jądrowy: polimerazę poli(ADP-rybozy) (PARS-1) (Bai i wsp., 2007; Cohausz i wsp., 2008; Hegedus i wsp., 2008). Do chwili obecnej kontrowersyjne pozostaje znaczenie PARS w mechanizmie śmierci. Dane literaturowe wskazują na udział tego enzymu i w śmierci nekrotycznej zależnej od wyczerpania puli ATP. Istnieją również doniesienia wskazujące na jego udział w programowanej śmierci komórki zależnej od kaspaz lub też od AIF.

Wang i wsp. (2009) stwierdzili, że w warunkach stresu genotoksycznego powodującego masowe uszkodzenie DNA, może dochodzić do nadmiernej aktywacji PARS-1, zużycia β NAD⁺ i ATP, a w konsekwencji do nekrotycznej śmierci komórki. Badania Houra i wsp. (1999) prowadzone na hodowli komórek NIH 3T3 wykazały, że MNNG doprowadza do aktywacji kaspaz i do degradacji PARS-1, a także do uwalniania cytochromu c i do apoptotycznej śmierci komórki zależnej od kaspaz.

Najnowsze badania wskazują na istotną rolę produktu enzymatycznej reakcji PARS-1, poli(ADP-rybozy) (PAR). Jest ona bardzo ważną molekułą sygnalizacyjną, która bierze udział w przekazywaniu informacji pomiędzy jądrem komórkowym a mitochondrium (Otera i wsp., 2005; Yu i wsp., 2006). Wyniki wskazują, że PAR poprzez zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej może być odpowiedzialny za uwalnianie AIF, co w konsekwencji może doprowadzać do apoptozy niezależnej od kaspaz (Yu i wsp., 2006). Do chwili obecnej brak jednak danych dotyczących wyjaśnienia mechanizmu w jaki sposób PAR oddziałuje na AIF. Dlatego też, w warunkach stresu genotoksycznego zbadano przeżywalność linii komórkowej HT22 oraz poziom immunoreaktywności PAR. Zaobserwowany został spadek przeżywalności komórek wraz ze wzrostem stężenia czynnika genotoksycznego. Zmianom tym towarzyszył zwiększony poziom immunoreaktywności cząsteczki PAR, co wskazuje na zwiększoną aktywność jądrowego enzymu PARS-1 i prawdopodobnie na obniżoną degradację PAR przez PARG. Zbadano również poziom immunoreaktywności białka AIF. Wzrostowi umieralności komórek towarzyszył spadek poziomu białka AIF we frakcji mitochondrialnej, z jednoczesnym wzrostem jego poziomu we frakcji jądrowej. Wynik ten potwierdza dane dotyczące translokacji AIF z mitochondrium do jądra komórki i apoptozę AIF-zależną. Jest również zgodny z wynikami badań prowadzonymi przez Yu i wsp. (2002), którzy jako główny czynnik, molekułę sygnalizacyjną odpowiedzialną za uwalnianie AIF z mitochondrium, przedstawiają PAR. Sugeruje się, że związek ten prawdopodobnie umożliwia tworzenie specjalnych porów w błonie mitochondrialnej, pozwalających na wydostanie się AIF do cytoplazmy komórki, a w dalszej części do jądra (Yu i wsp., 2006).

Wcześniejsze badania prowadzone na komórkach NIH3T3, HeLa S3 oraz na fibroblastach mysich neuronów (MEF) pokazały, że wywołane przez czynniki alkilujące uszkodzenie DNA wpływa na nadmierną aktywność PARS-1 (Hour i wsp., 1999, Yu i wsp., 2006; Cohausz i wsp., 2008; Wang i wsp., 2009). Istnieją jednak dane wskazujące na jego degradację (Rotem-Dai i wsp., 2009). W obecnej pracy w warunkach stresu genotoksycznego przebadane zostały inhibitory PARS-1. Wykazano, iż zastosowanie 3-AB i PJ 34 wyraźnie wpływało na poprawę przeżywalności neuronów hipokampa (HT22) w odpowiedzi na stres genotoksyczny. Co ciekawe, związki te wykazywały znaczący efekt protekcyjny

nawet, gdy stosowane były 30 minut po zadziałaniu stresora. Powyższe inhibitory działy protekcyjnie na mitochondria, zapobiegajęc translokacji białka AIF. Wydaje się więc, że to śmierć komórki zależna od PARS-1/PAR/AIF, określana jako partanatos, odpowiedzialna jest za obumieranie komórek neuronalnych HT22 w stresie genotoksycznym (Cieřlik i wsp., 2009). Przytoczone badania pod znakiem zapytania stawiają sugestię o skuteczność obniżenia ekspresji genu dla AIF przy użyciu krótkiego hamujęcgo iRNA. Prowadząc badania na komórkowej linii tymocytów w warunkach stresu genotoksycznego, również Bai i wsp. (2007) uzyskali dane świadczące o protekcyjnym działaniu PJ 34. Pozytywne działanie 3-AB potwierdzone zostało na linii komórek CCRF-CEM w warunkach stresu genotoksycznego (Pogrebniak i wsp., 2003). Istnieją jednak dane wskazujące, że stres genotoksyczny i wzmożona aktywacja PARS-1 nie wpływają na translokację AIF, a jedynie (przez wyczerpanie puli związków energetycznych w komórce) prowadzą do nekrozy (Hegedus i wsp., 2008). Badania na zwieręcym modelu niedokrwienia wskazują na udział AIF i PARS w śmierci komórek po niedokrwieniu i dotyczy to stresu oksydacyjnego wywołanego przywróceniem kręzenia (Strosznajder i wsp., 2003, 2005; Strosznajder i Gajkowska, 2006, Strosznajder i wsp., 2010).

W wyniku ciągłych poszukiwań inhibitorów PARS nowej generacji, Alano i wsp. (2006) wykazali, iż dwa antybiotyki z grupy tetracyklin trzeciej generacji: minocyklina i doksycyklina, posiadają takie właściwości. Badania na komórkach mięśnia sercowego w warunkach niedokrwienia i reperfuzji, pokazały, iż minocyklina wpływała na utrzymanie puli NAD⁺ w komórkach i hamowanie tworzenia PAR, co chroni komórki przed śmiercią (Tao i wsp., 2010), a tym samym zmniejszała rozmiar zawału (Yong i wsp., 2004).

Dlatego też oba związki przebadane zostały na neuronach hipokampa w warunkach stresu genotoksycznego. Zastosowanie zarówno minocykliny jak i doksycykliny wykazywało znaczące działanie protekcyjne i hamowało wpływ AIF z mitochondrium i jego translokację do jądra komórek HT22. Dane literaturowe wskazują na istotne znaczenie tetracyklin w stresie oksydacyjnym i w ekscytotoksyczności glutaminianu (Orsucci i wsp., 2008), a także w wielu schorzeniach neurodegeneracyjnych: chorobie Parkinsona (Du i wsp., 2003) czy

Huntingtona (Morimoto i wsp., 2002; Yrjanheikki i wsp., 2005), a także w chorobach sercowo-naczyniowych i udarze (Yong i wsp., 2004; Lampl i wsp., 2007).

Na złożoność regulacji mechanizmów przeżycia i śmierci komórki przebiegających z zaangażowaniem wielu szlaków jednocześnie nakłada się jeszcze specyfika działających czynników środowiska, właściwości biochemiczne i wrażliwość komórek. Badania nad programowaną śmiercią komórki zależną od AIF prowadzone przez Cohausza i wsp. (2008) na komórkach HeLa i fibroblastach mysich neuronów (MEFs) wykazały, iż w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego przez MNNG dochodziło do aktywacji kaspazy: 7 i 9 oraz do obniżenia poziomu związków energetycznych (zmiana stosunku ADP/ATP), a inhibitory kaspaz zapobiegały śmierci komórek. Z kolei doświadczenia prowadzone przez Dodoni i wsp. (2004) wskazały na istotne protekcyjne znaczenie cyklosporyny A, inhibitora megakanalu mitochondrialnego, który chronił komórki przed toksycznością MNNG. Dlatego też w niniejszej pracy przetestowane zostały inhibitor mega kanału mitochondrialnego (Cyklosporyna A), inhibitor kaspaz-3 (Z-DEVD-FMK) oraz inhibitor białka p53, jednak żaden z nich nie wykazał cytoprotekcyjnego działania. Badania Węsierskiej-Gądek i wsp. (2003) a także Hegedus i wsp. (2008) wykazały również brak udziału kaspaz w śmierci komórek w wyniku działania stresu genotoksycznego. Badacze ci zwrócili natomiast uwagę na istotne znaczenie kinazy białkowej C (PKC). Jej długotrwała aktywacja obniżała nadmierną aktywność PARS-1 wywołaną przez MNNG. Natomiast aktywator PKC (PMA) wpływał na fosforylację PARS-1, w konsekwencji prowadząc do ochrony komórek przed śmiercią nekrotyczną (Hegedus i wsp., 2008). Badania na linii komórek nowotworowych MCF-7 w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego promieniami UVC wskazały na istotne znaczenie nowej izoformy kinazy – PKC ϵ . Indukowany wzrost ekspresji tej kinazy wpływał na wzrost przeżywalności komórek i zahamowanie cięcia PARS-1 przez kaspazę w tych warunkach. (Rotem-Dai i wsp., 2009). Dane literaturowe wskazują, że w mechanizm śmierci komórek na drodze zależnej od PARS-1 zaangażowane są również inne kinazy białkowe. Mogą one bezpośrednio wpływać na fosforylację PARS-1, a tym samym jego aktywność (Kauppinen i wsp., 2006). Ponadto aktywność PARS-1 i poli(ADP-rybozyl)acja może wpływać na aktywność kinaz (Monaco i wsp., 2005). W kolejnych doświadczeniach w warunkach

stresu genotoksycznego i wzmoęonej aktywnořci PARS-1 przebadane zostały inhibitory kinaz białkowych C i G (GF109203x inhibitor PKC i KT5823 inhibitor PKG). W badanym układzie eksperymentalnym nie wykazano różnic w śmiertelności komórek w wyniku działania stosowanych inhibitorów.

Istotne znaczenie w mechanizmie regulacji aktywnořci PARS-1 wydaje się odgrywać ERK1/2, kinaza naleęąca do duęej rodziny kinaz aktywowanych mitogenami. Ethier i wsp. (2007) wykazali, że w warunkach wzmoęonej syntezy PAR dochodzi do obnięenia fosforylacji ERK1/2, co w konsekwencji prowadzi do wypływu białek proapoptotycznych na czele z cytochromem c. Zastosowanie inhibitora PARS-1 (PJ 34), a tym samym obnięenie poziomu PAR, skutkowało aktywacją ERK1/2 i prowadziło do cytoprotekcji (Kauppinen i wsp., 2007).

Dane literaturowe wskazują, że białkowa kinaza ERK1/2 oprócz swej dobrze poznanej roli pro-ęyciowej, może być równieę zaangażowana w śmierć pewnych typów komórek. Do jej wzmoęonej aktywacji może dochodzić w zwierzęcym modelu niedokrwienia, w warunkach stresu oksydacyjnego i po zadziałaniu cisplatyną. Doświadczzenia Okano i Rustęgi (2001) pokazały, że inhibitor ERK hamuje aktywację PARS w komórkach płasko komórkowego nowotworu przełyku. Podobne wyniki uzyskane zostały po zahamowaniu kinazy serynowo/treoninowej CHK1, która wpływała na aktywację ERK1/2, prowadząc do fosforylacji histonu H2AX i zahamowania PARS-1 (Mitchell i wsp., 2010). W przedstawionej pracy działanie inhibitora ERK1/2 zbadane zostało równieę w stresie genotoksycznym. Badania własne wykazały protekcyjny wpływ zahamowania aktywnořci ERK1/2 w komórkach HT22 podanych stresowi, wywołanemu przez MNNG. Zmiany aktywnořci ERK1/2 mogą w istotny sposób wpływać na poziom PAR.

Poziom PAR w komórce regulowany jest nie tylko przez PARS-1, ale takęe przez glikohyrolazę poli(ADP-rybozy) (PARG). Enzym ten wykazuje aktywność egzo- i endoglikozydazy i hydrolizuje wiązanie glikozydowe pomiędzy jednostkami ADP-rybozy w cząsteczce PAR (D'Amours i wsp., 1999; Davidovic i wsp., 2001). W prezentowanych badaniach w warunkach stresu genotoksycznego zastosowanie inhibitora PARG, wiążące się z utrzymaniem PAR, obnięało przeęywalność komórek.

Wiadomo, że w apoptozie zależnej od AIF/PARS/PAR/ uczestniczą proteazy zależne od jonów wapnia – kalpainy (Wang i wsp., 2009). W badaniach prowadzonych przez Boland`a i Campbell`a (2003) na komórkach kory mózgu traktowanych A β , obserwowany był wzrost aktywności kalpain, a także PARS-1. Zastosowanie inhibitora tych proteaz - MDL 28170, skutkowało obniżeniem aktywności PARS-1. Również w niniejszej pracy użyty został wymieniony powyżej inhibitor kalpainy. Jego zastosowanie w hodowli komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego skutkowało wzrostem przeżywalności komórek.

Jedną z ważniejszych kinaz przyczyniającą się do przeżycia komórek jest kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PI3-K). Pośredniczy ona w odpowiedzi na czynniki wzrostu i dopowiada za fosforylację wielu białek związanych z regulacją podstawowych procesów komórkowych (Dudek i wsp., 1997; Strosznajder i Strosznajder, 2008). Niedawno stwierdzone zostało, że kinaza AKT (główna kinaza odbierająca sygnały od PI3-K) blokuje translokację AIF do jądra komórki w odpowiedzi na sygnał proapoptotyczny indukowany ceramidem (King i wsp., 2004). W przedstawionej pracy zastosowanie inhibitora PI3-K (LY-294002) skutkowało jeszcze większym obniżeniem przeżywalności komórek w stosunku do samego MNNG. Wynik ten wskazuje na udział PI3-K w procesie przeżycia, ale niewielkiej puli komórek HT22 w warunkach stosowanego stresu. Natomiast zastosowanie tego inhibitora wraz z PJ 34 sugeruje, że zahamowanie PARS-1 wpływa na aktywację szlaku zależnego od PI3-K.

W poszukiwaniu nowych związków neuroprotektyjnych w niniejszej pracy zbadane zostało działanie wielonienasyconego kwasu tłuszczowego omega-3, dokozaheksaenowego (DHA). Kwas ten jest ważnym składnikiem fosfolipidów błonowych, o właściwościach niezbędnych dla prawidłowego rozwoju zdolności poznawczych. Jego brak lub peroksydacja wydają się być odpowiedzialne za sygnał prozapalny, degenerację komórek siatkówki i dysfunkcję neuronów w chorobie Alzheimera, a także za postępujące z wiekiem zaburzenia poznawcze (Lukiw i Bazan, 2008; Dyal 2010). DHA jest prekursorem licznej grupy związków zwanych dokozanoidami (w tym neuroprotektyny D, NPD₁) o właściwościach protekcyjnych. W badaniach na linii komórek HT22 w warunkach stresu genotoksycznego wykazano protekcyjne działanie DHA w zakresie

stężeń 10-30 μM . Zastosowanie DHA w powyższych warunkach skutkowało zatrzymaniem wypływu AIF w mitochondriach i brakiem jego translokacji do jądra komórki. Podobne wyniki uzyskane zostały przez Suphioglu i wsp. (2010). W prowadzonych przez nich badaniach na komórkach ludzkiej neuroblastomy (M17) wykazano bezpośrednią zależność pomiędzy traktowaniem DHA a apoptozą. DHA w stężeniu 20 μM obniżał o ponad 60% aktywność kaspazy-3, białka egzekutorowego apoptozy. Badacze Ci zwrócili również uwagę, że protekcyjna rola DHA jest nierozzerwalnie złączona z zależnym od PI3-K/AKT szlakiem przekąźnictwa komórkowego. Natomiast dane Green'a i wsp. (2001) sugerują, że neuroprotekcyjne działanie DHA jest związane z jego zdolnością do obniżenia poziomu peroksydacji lipidów w mózgu. Doświadczenia prowadzone na szczurach o diecie bogatej w DHA wykazały znaczące obniżenie poziomu uszkodzonych lipidów w mózгах tych zwierząt, w porównaniu z kontrolą (Kubo i wsp., 1998, Dyll 2010). Dane te wskazują, że DHA może odgrywać istotną rolę antyoksydacyjną. Yavin i wsp. (2002) sugerują kilka potencjalnych mechanizmów tego zjawiska, między innymi zdolność DHA do aktywacji enzymów antyoksydacyjnych. A Green i wsp. (2001) pokazują, że obniżenie reaktywnych form tlenu przez DHA zachodzi przez wzrost produkcji NO, co może wpływać na obniżenie puli aktywnej formy rodnika ponadtlenkowego, a tym samym na obniżenie liczby wolnych rodników i uszkodzeń oksydacyjnych w odpowiednich warunkach środowiskowych (Dyll 2010). Dane doświadczalne Banasika i wsp. (1992) wykazały, że nienasycone kwasy tłuszczowe, w tym kwas α linolenowy (ALA, ang. *alpha-linolenic acid*), mają zdolność do hamowania aktywności PARS-1. Wydaje się, że również DHA wykazuje właściwości hamujące aktywność PARS-1. Dane Lukiw'a i Bazan'a (2008) pokazują, iż w toku przemian metabolicznych DHA dochodzi do powstania NPD₁. Związek ten wykazuje właściwości cytoprotekcyjne, gdyż umożliwia utrzymanie integralności błony komórkowej, nasila ekspresję białek antyapoptotycznych, a ponadto może hamować drogi przekąźnictwa komórkowego prowadzące do programowanej śmierci komórki.

Białka z rodziny BCL są ważnymi regulatorami apoptozy. Aktywacja ekspresji i poziomu białka BAX wpływa na jego oligomeryzację, co w konsekwencji może skutkować zmianami interakcji białko-białko (w tym białka 14-3-3)

i zmianami fosforylacji, wpływając na jego translokację do mitochondriów. Interakcja BAX może powodować zmiany konformacyjne wewnętrznej błony mitochondrialnej i może prowadzić do uwolnienia m.in. AIF. Badania Cabona i wsp. (2011) wykazały, że sygnał związany z aktywacją i translokacją BAX, prowadzi do uwolnienia AIF z mitochondriów i jest kluczowym warunkiem prowadzącym do nekroptozy w warunkach działania MNNG (Cabon i wsp., 2011). W przedstawionej pracy zbadana została ekspresja genów dla białek Bcl-2, Bcl-XL i Bax w warunkach uszkodzenia DNA wywołanego alkilacją. Doświadczenia wykazały wzrost ekspresji dla białka proapoptotycznego Bax oraz spadek ekspresji białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-XL. Badania dotyczące ekspresji białek z rodziny Bcl skupiają się głównie wokół komórek nowotworowych. W doświadczeniach prowadzonych po zastosowaniu Kadheryny E, związku spowalniającego nowotworzenie, wykazano wzrost ekspresji genu dla Bcl-2 (Friess i wsp., 1998; Miyamoto i wsp., 1999). Natomiast wzrost ekspresji dla Bax obserwowany był w komórkach nowotworowych trzustki (Ferreira i wsp., 2011). Dodatkowo w badaniach na komórkach regionu CA1 szczurzego hipokampa w modelu hipotermii wykazano wzrost ekspresji zarówno genu Bcl-2 jak i Bax. Badacze Ci sugerowali zaangażowanie tych genów w proces obumierania komórek w tym regionie (Zhang i wsp. 2006). Badania Strosznajder i Gajkowskiej, (2006) wykazały istotne zmiany lokalizacji tych białek po niedokrwieniu mózgu. Analiza wpływu promieniowania jonizującego na ludzkie komórki wykazała wzrost ekspresji genu antyapoptotycznego Bcl-XL. W warunkach tych poziom Bcl-2 ulegał obniżeniu. Ekspresja obu genów, podobnie jak i Bax, zależna była od prawidłowej funkcji białka p53 (Zhan i wsp., 1996).

Podsumowując uzyskane wyniki wykazano, że w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego zwiększonym uwalnianiem peptydów amyloidu β w komórkach transfekowanych białkiem APP, jak też w wyniku działania peptydów A β 1-42 podanych zewnątrzkomórkowo, obserwuje się podwyższony poziom mitochondrialnego białka AIF, któremu towarzyszy obniżenie aktywności jądrowego enzymy PARS-1. Podobny podwyższony poziom AIF obserwowany był w mitochondriach komórek kory mózgu i prądkowia w zwierzęcym modelu choroby Alzheimera u myszy APP^{+/+}, jak i w warunkach stresu nitrozacyjnego o umiarkowanym nasileniu (100 μ M SNP). W warunkach tych

pomimo wzrostu poziomu wolnych rodników i daleko posuniętych zaburzeń strukturalnych, komórki przeżywają lub obumiera ich stosunkowo niewielka ilość. Powyższe dane mogą wskazywać na istotną adaptacyjno-obronną rolę AIF.

Natomiast stres genotoksyczny związany z alkilacyjnym uszkodzeniem DNA prowadzi do uwolnienia AIF i jego translokacji do jądra neuronów hipokampa, komórek HT22. Wynikiem tego procesu jest zależna od AIF/PARS/PAR śmierć komórek nerwowych HT22. Inhibitory PARS-1 poprzez zapobieganie uwalniania AIF z mitochondriów i hamowanie syntezy PAR, w znaczący sposób zwiększają przeżycie komórek poddanych stresowi genotoksycznemu. Podobne działanie wykazują tetracykliny trzeciej generacji oraz kwas dokozaheksaenowy, które w znaczny sposób chronią komórki neuronalne przed śmiercią.

Podsumowanie i wnioski

- ◆ Stwierdzono podwyższony poziom białka AIF w mitochondriach komórek PC12 transfekowanych genem APP z mutacją szwedzką (APP^{sw}) oraz w zwierzęcym modelu AD u myszy transgenicznym z mutacją londyńską APP^{+/+}. Te same zmiany wykazano w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogenego A β 1-42 i stresu nitrozacyjnego. W wymienionych warunkach stwierdzono obumieranie niewielkiej puli komórek.

Wyniki te mogą wskazywać na udział białka AIF w procesach obronnych/adaptacyjnych umożliwiających przeżycie komórek.

- ◆ Obniżenie aktywności PARS-1 w komórkach APP^{sw} może być spowodowane działaniem NO uwalnianego przez A β lub z automodyfikacją enzymu. Stwierdzona modyfikacja enzymu wyklucza jego aktywny udział zarówno w mechanizmie naprawy DNA jak i w mechanizmie śmierci komórek.
- ◆ W warunkach stresu genotoksycznego wywołanego zależną od MNNG alkilacją DNA inhibitory PARS-1 chronią komórki przed syntezą PAR, uwalnianiem AIF z mitochondriów i jego translokacją do jądra. W efekcie zwiększają one znacząco przeżycie neuronalnych komórek HT22. Tetra-cykliny trzeciej generacji oraz wielonienasycony kwas DHA wykazują również istotne cytoprotekcyjne działanie.

Uzyskane wyniki wskazują na fundamentalne znaczenie ścieżki sygnałowej zależnej od AIF i PARS-1/PAR w mechanizmie śmierci komórek HT22 w wyniku działania czynnika genotoksycznego MNNG.

- ◆ W śmierć komórek zależną od MNNG nie są zaangażowane: PKC i PKG, megakanal mitochondrialny, białko p53 ani też kaspaza-3.

- ♦ Stres genotoksyczny wywołany MNNG powoduje obniżenie ekspresji białek antyapoptotycznych, Bcl-Xl i Bcl-2 oraz wzrost ekspresji genu dla białka proapoptotycznego Bax.

Zaburzenie ekspresji tych białek i ich wzajemnych relacji może przyczyniać się zmiany funkcji mitochondriów i wpływu AIF w badanych warunkach.

Streszczenie

Stres oksydacyjny uważany jest za jeden z głównych elementów patogenezы chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Alzheimera i Parkinsona. Pomimo intensywnych badań, dokładny mechanizm prowadzący do stresu oksydacyjnego w tych schorzeniach nie jest dokładnie poznany, a zjawiska molekularne i szlaki obumierania komórek spowodowane aktywacją stresu oksydacyjnego i genotoksycznego, nie są w pełni wyjaśnione. W wyniku działania wolnych rodników może dochodzić do zmian wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału, ekspresji genów oraz zmian strukturalnych, w tym do zaburzenia funkcji mitochondriów i enzymów naprawy DNA. W konsekwencji zmiany te mogą prowadzić do aktywacji szlaków śmierci komórki. Poznanie mechanizmów warunkujących przeżycie lub doprowadzających do śmierci jest istotne w odniesieniu do nowych działań neuroprotekcyjnych.

Zaburzenia funkcji mitochondriów są jednym z kluczowych zjawisk związanych z patomechanizmem wielu chorób neurodegeneracyjnych. Jednym z głównych białek zaangażowanych w prawidłową funkcję mitochondriów jest czynnik indukujący apoptozę (AIF), a jądrowym odbiorcą licznych szlaków przekazywania i kaskady wolnorodnikowej jest PARS-1.

AIF to flawoproteina związana z przestrzenią międzybłonową mitochondriów, która razem z białkami AMID i AIFL współtworzy rodzinę białek. Ich funkcje fizjo-patologiczne nie są w jeszcze w pełni poznane. W warunkach fizjologicznych AIF posiada właściwości oksydoreduktazy NADH i odgrywa istotną rolę w fosforylacji oksydacyjnej i obronie wolnorodnikowej (Susin i wsp., 1999; Miramar i wsp., 2001; Hagen i wsp., 2010). Zawiera trzy funkcjonalne domeny: wiążącą FAD, wiążącą NADH i domenę C-kończącą (Otera i wsp., 2005; Modjtahedi i wsp., 2006). Dwie pierwsze domeny AIF odpowiedzialne są za oksydoredukcyjną funkcję białka i w warunkach fizjologicznych biorą udział w transporcie elektronów jako elementy składowe kompleksu I i III łańcucha transportu elektronów (Miramar i wsp., 2001; Vashen i wsp., 2004; Modjtahedi i wsp., 2006; Hagen i wsp., 2010). Wiadomo również, że domena C-kończąca odpowie-

dzialna jest za wlaściwości apototyczne AIF i w odpowiedzi na sygnał proapoptotyczny białko to transportowane jest z mitochondrium do jądra komórki, gdzie wraz z cyklofiliną A indukuje kondensację chromatyny i fragmentację DNA, na drodze niezależnej od kaspaz (Hong i wsp., 2004; Yu i wsp., 2006; Krantic i wsp., 2007).

Dotychczasowe badania pokazują, że białko AIF jest bardzo konserwatywne ewolucyjnie i niezbędne dla rozwoju embrionalnego (już od dziewiątego dnia) (Brown i wsp., 2006). Jego brak prowadzi do neurodegeneracji, zaniku mięśni szkieletowych i kardiomiopatii (Klein i wsp., 2002). A ponadto, jego niska ekspresja wpływa na upośledzenie homeostazy wolnych rodników (Apostolova i wsp., 2006), co w konsekwencji prowadzi do stresu oksydacyjnego i uszkodzenia makromolekuł. Oksydacja DNA i jedno lub dwuniciowe jego pęknięcie powodują aktywację jądrowego enzymu syntazy poli(ADP-rybozy) (PARS), określanej poprzednio mianem polimerazy (PARP) (Yu i wsp., 2002; Strosznajder i wsp., 2005, 2011; Moroni i wsp. 2011). PARS-1 bierze udział w wykryciu oraz naprawie uszkodzeń DNA, modyfikacji chromatyny oraz w regulacji transkrypcji. Jest on kluczowy dla przebiegu wielu patofizjologicznych i patologicznych procesów takich jak: utrzymanie stabilności genomu, starzenie, stan zapalny, czy karcenogeneza (Strosznajder i wsp., 2003; Beneke i Burkle, 2007, Moroni, 2008; AbdElmageed i wsp., 2011; Moroni i wsp., 2011). W warunkach stresu oksydacyjnego i genotoksycznego dochodzi do nadmiernej aktywacji PARS-1, zużycia βNAD^+ i w konsekwencji ATP. Ponadto produkt PARS-1, poli(ADP-ryboza) PAR jest cząstką sygnalizacyjną, której zwiążanie się z błoną mitochondrialną może prowadzić do wypływu AIF z mitochondriów i jego translokacji do jądra (Yu i wsp., 2006). W konsekwencji prowadzi to do śmierci komórki na drodze apoptozy niezależnej od kaspaz.

Podjęte w niniejszej pracy zagadnienia miały na celu zbadanie ekspresji genu, poziomu białka i udziału AIF w procesach przeżycia i śmierci komórek w warunkach działania peptydów Amyloidu β . W badaniach uwzględniono czynniki zaangażowane w aktywację stresu oksydacyjnego/nitrozacyjnego i genotoksycznego. Zbadano zależności pomiędzy poziomem AIF w mitochondriach a aktywnością PARS-1/poziomem PAR i przeżywalnością komórek. Oce-

niano działanie cytoprotekcyjne inhibitorów wybranych enzymów oraz licznych związków czynnych farmakologicznie.

Badania prowadzono na szczurzych komórkach pochodzenia nerwowego PC12 oraz na mysich neuronach hipokampa HT22. Do badań użyto komórki PC12 transfekowane pustym wektorem oraz ludzkim genem dla białka prekursorowego A β typu dzikiego APPwt i genem z mutacją szwedzką APPsw, które endogennie uwalniają peptydy A β . Ponadto komórki PC12 poddano zewnątrzkomórkowemu działaniu egzogennych peptydów A β i dodatkowemu stresowi nitrozacyjnemu. Wyniki dotyczące poziomu i ekspresji AIF po działaniu peptydów A β porównywano z danymi uzyskanymi w badaniach na zwierzętach transgenicznym - myszach z mutacją londyńską w genie dla APP (FVBTg(Thy1;APP)^{Val717Ile}), które stanowią model rodzinnej choroby Alzheimera. W badaniach molekularnych zjawisk wpływających na poziom AIF w mitochondriach i jego translokację do jądra, szczególną uwagę zwrócono na aktywność i integralność jądrowego enzymu PARS-1. 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. Udział AIF w molekularnych mechanizmach przeżycia i śmierci komórek badano również w warunkach stresu genotoksycznego, wywołanego alkilacją DNA przez związek genotoksyczny – MNNG. Związki genotoksyczne są szeroko rozpowszechnione w środowisku naturalnym. Należą do nich składowe dymu papierosowego, produkty uboczne procesów przemysłowych czy leki stosowane w terapii antynowotworowej. Ich mechanizm działania i skutki, jakie wywołują w organizmach żywych, a w szczególności w komórkach nerwowych, nie są wystarczająco dobrze poznane. Szczególną uwagę w prowadzonych doświadczeniach zwrócono na znaczenie PARS-1 i pod tym względem przetestowano liczne związki o charakterze neuroprotekcijnym.

W prezentowanych przez nas badaniach zależny od stężenia A β stres oksydacyjny w mitochondriach trzech linii komórek PC12 transfekowanych genem białka dla APP oraz w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennego peptydu A β 1-42, powodował wzrost poziomu białka AIF. Działanie stresu nitrozacyjnego wywołanego donorem NO także wpływało na wzrost poziomu

białka AIF w mitochondriach. W warunkach tych obserwowano nieznaczny odsetek obumierających komórek. Podwyższony poziom białka AIF obserwowano również w korze mózgu i prążkowie w zwierzęcym modelu choroby Alzheimera (AD) u myszy transgenicznym APP^{+/+} z mutacją londyńską. Powyższym zmianom towarzyszyło znaczące obniżenie aktywności PARS-1 zarówno w komórkach APP^{sw}, jak i po zastosowaniu donora NO (500 μM SNP).

W doświadczeniach prowadzonych w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego czynnikiem alkilującym DNA, MNNG, stwierdzono wzrost uwalniania AIF z mitochondriów, któremu towarzyszyło obumieranie znaczącej puli komórek. Efekt ten był niwelowany przez zastosowanie inhibitorów PARS-1 (PJ 34 i 3AB), a także tetracyklin trzeciej generacji (mino- i doksycykliny) oraz wielonienasyconego kwasu DHA. Korzystne dodatkowe działanie wykazywało zahamowanie kalpajny (białka prawdopodobnie zaangażowanego w uwalnianie AIF), a także kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym ERK1/2.

Dodatkowo zaobserwowano, że stres genotoksyczny wywołany alkilacją DNA powoduje obniżenie ekspresji białek antyapoptotycznych, BclXl i Bcl2 oraz wzrost ekspresji genu dla białka proapoptotycznego Bax (mogącego przyczynić się do wypływu AIF z mitochondrium).

Podsumowując, uzyskane dane w przedstawionej pracy wskazują na istotny udział białka AIF w procesach obronnych/adaptacyjnych (umożliwiających przeżycie komórkom) w warunkach toksyczności peptydów Aβ działających endogennie i egzogennie, a także po zadziałaniu donora NO, SNP. Obserwowana obniżona aktywność enzymatyczna PARS-1 może być związana z udziałem uwalnianego przez Aβ NO i z automodyfikacją enzymu. Może również mieć miejsce degradacja PARS-1 w wyniku aktywacji kaspazy 3. Natomiast obniżenie to wyklucza udział PARS-1 w mechanizmie śmierci, ale może mieć istotne znaczenie w zaburzeniu procesów naprawy DNA.

W badaniach dotyczących mechanizmu śmierci komórek w stresie genotoksycznym wykazano, że ścieżka sygnałowa zależna od AIF oraz PARS-1/PAR odgrywa fundamentalną rolę w mechanizmie śmierci neuronów HT22 w wyniku działania związku alkilującego DNA, MNNG. W warunkach tych inhibitory

PARS-1 (PJ 34 i 3AB), tetracykliny trzeciej generacji (mino- i doksycyklina) oraz wielonienasycony kwas DHA chroniły komórki HT22 przed stresem genotoksycznym i śmiercią. Korzystne dodatkowe działanie wykazuje również zahamowanie kalpajny (białka prawdopodobnie zaangażowanego w uwalnianie AIF), a także kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym ERK1/2. W mechanizmie cytoprotekcyjnego działania inhibitorów PARS-1 stwierdza się udział PI-3 kinazy, a w śmierć komórek zależną od MNNG nie są zaangażowane: PKC i PKG, białko p53 jak również kaspaza-3.

Uzyskane wyniki badań mogą być pomocne w lepszym zrozumieniu mechanizmu śmierci komórek w wyniku działania stresu oksydacyjnego i genotoksycznego, który towarzyszy chorobom neurodegeneracyjnym oraz działaniu licznych toksyn środowiskowych. Ponadto mogą ułatwić wskazanie punktów uchwytu dla skutecznej cytoprotekcji.

Literatura

Abd Elmageed ZY, Naura AS, Errami Y, Zerfaoui M **(2011)** The Poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs): New roles in intracellular transport. *Cell Signal*. 24(1):1-8 (online)

Abramov AY, Canevari L, Duchen MR **(2004)** β -amyloid peptides induce mitochondria dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neuron through activation of NADPH oxidase. *Neurobiol Dis*. 24(2):565-575

Adamczyk A, Kaźmierczak A, Czapski GA, Strosznajder JB **(2010)** Alpha-synuclein induced cell death in mouse hippocampal (HT22) cells is mediated by nitric oxide-dependent activation of caspase-3. *FEBS Lett*. 4;584(15):3504-8.

Alano CC, Kaupinen TM, Valls AV, Swanson RA **(2006)** Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentration. *PNAS* 103(25): 9685-9690

Ame JC, Spenlehauer C, Muricia G **(2004)** The PARS superfamily. *Bioessays*. 26; 882-893

Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin MA, Avadhani NG **(2003)** Mitochondrial targeting and a novel transmembrane agent of Alzheimer's amyloid precursor protein impair mitochondria function in neuronal cells. *J Cell Biol*. 161:1-14

Andrabi SA, Kim NS, Yu SW, Wang H, Koh DW, Sasaki M, Klaus JA, Otsuka T, Zhang Z, Koehler RC, Hurn PD, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM **(2006)** Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103; 18303-18313

Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. **(2008)** Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann N Y Acad Sci*. 1147; 233-41.

Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA **(2005)** Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*. 70; 200-214

Apostolova N, Cervera AM, Victor VM, Cadenas S, Sanjuan-Pla A, AlvarezBarrientos A, Esplugues JV, McCreath KJ **(2006)** Loss of apoptosis-inducing factor leads to an increase in reactive oxygen species, and an impairment of respiration that can be reversed by antioxidants, *Cell Death Differ*. 13; 354-357

Arnoult D, Parone P, Martinou JC, Antonsson B, Estaquier J, Ameisen JC **(2002)** Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol*. 159(6); 923-929

Atamna H, Boyle K. **(2006)** Amyloid-beta peptide binds with heme to form a peroxidase: Relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease. *PNAS* 103: 3381-3386

- Bai P, Hegedus C, Erdeylyi K, Szabo E, Bakondi E, Gergely S, Szabo C, Virag L (2007) Protein tyrosine nitration and poly(ADP-ribose) polymerase activation in MNNG treated thymocytes: Implication for cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 170; 203-213.
- Bajt ML, Ramachandran A, Yan H-M, Lebofsky M, Farhood A, Lemasters JJ, Jaeschke H (2011) Apoptosis-Inducing Factor Modulates Mitochondrial Oxidant Stress in Acetaminophen Hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* on line
- Banasik M, Komurall H, Shimoyamall M, Ueda K (1992) Specific Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Synthetase and mono(ADP-Ribosyl) transferase. *J Biol Chem.* 267; 1569-1575
- Beneke S i Burkle A (2007) Poly(ADP-ribosyl)ation in mammalian ageing. *Nucleic Acids Research*, 35, 22; 7456-7465
- Boland B, Campbell V (2003) β -Amyloid (1-40)-induced apoptosis of cultured cortical neurones involves calpain-mediated cleavage of poly-ADP-ribose polymerase. *Neurobiol Aging.* 24; 179-186
- Bolanos JP, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, Heales SJ (1997) Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain; mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem.* 68; 2227-2240
- Bolanos JP, Almeida A, Medina JM (1998) Nitric oxide mediates brain mitochondrial damage during perinatal anoxia. *Brain Res.* 787(1); 117-122
- Boujard H, Gubina O, Robert N, Krantic S, Susin SA (2007) AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell. Cycle.* 6; 2612-2619
- Braęoszowski P, Ostrowski P (2011) Medycyna mitochondrialna. *Postępy nauk Medycznych* 2; 138-148
- Bredt DS, Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 682-685
- Brookes PS (2005) Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic Biol. Med* 38; 12-23
- Brown D, Yu BD, Joza N, Benit P, Meneses J, Firpo M, Rustin P, Penninger JM, Martin GR (2006) Loss of Aif function causes cell death in the mouse embryo, but the temporal progression of patterning is normal. *PNAS*, 103, 26; 9918-9923
- Brune B, DDimmeler S, Molinay Vedia L, Lapetina EG (1994) Nitric oxide; a signal for ADP-ribosylation of proteins. *Life Sci.* 54; 61-70
- Butterfield DA (2003) Amyloid beta-peptide 1-42-associated free radicals-induced oxidative stress nad neurodegeneration in Alzheimer's disease brain: mechanism and consequences. *Curr Med Chem.* 10(24): 2651-2659
- Bronson RT, Lane PW, Harris BS, Davisson MT (1990) Harlequin (Hq) products progressive cerebellar atrophy. *Mouse genome.* 87; 110.

Cabon L, Galán-Malo P, Bouharrou A, Delavallée L, Brunelle-Navas MN, Lorenzo HK, Gross A, Susin SA (2011) BID regulates AIF-mediated caspase-independent necroptosis by promoting BAX activation. *Cell Death Differ.* (online)

Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.* 531: 5–23

Cao G, Xing J, Xiao X, Liou AK, Gao Y, Yin XM, Clark RS, Graham SH, Chen J (2007) Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis inducing-factor in ischemic neuronal injury. *J. Neurosci.* 27;9278-9293.

Calson T, Ruiz T, Schagger H, Peng G, Zickermann V, Brandt U, Michel H, Radermacher M (2009) The structure of eukaryotic and prokaryotic complex I. *J. Struct. Biol.* 169; 81-88

Casley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, Sharpe MA (2002) Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem.* 80(1):91-100

Chalimoniuk M, Stolecka A, Cakała M, Hauptmann S, Schulz K, Lipka U, Leuner K, Eckert, A. Muller, W.E., Strosznajder JB (2007) Amyloid beta enhances cytosolic phospholipase A2 level and arachidonic acid release via nitric oxide in APP-transfected PC12 cells. *Acta Biochim Pol.* 54(3): 611-623

Chambon P, Weil JD, Mandel P (1963) Nicotynamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenylic acid synthesing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* 11; 39-43

Cheng IH, Scearce-Levie K, Legleiter J, Palop JJ, Gerstein H, Bien-Ly N, Puolivali J, Lesne S, Ashe KH, Muchowski PJ, Mucke L (2007) Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem* 282(33); 23818-23828

Cheung EC, Melanson-Drapeau L, Cragen SP, Vanderluit JL, Ferguson KL, McIntosh WC, Park DS, Bennett SA, Slack RS (2005) Apoptosis inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by Bax-dependent and Bax-independent mechanism. *J. Neurosci.* 25; 1324-1334

Cheung EC, Joza N, Steenaart NA, McClellan KA, Neuspiel M, Mc Namara S, MacLaurin JG, Rippstein P, Park DS, Shore GC, McBride HM, Penninger JM, Slack RS (2006) Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. *EMBO J.* 25; 4061-4073

Chinta SJ, Rane A, Yadava N, Andersen JK, Nicholls DG, Polster BM (2009) Reactive oxygen species regulation by AIF and complex I – dependent brain mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 46; 939-947

Churbanova IY, Sevrioukova IF (2008) Redox-dependent changes in molecular properties of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem.* 283(9):5622-5631

- Cieřlik M, Jacewicz M, Strosznajder JB (2009) Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase protect hippocampal neurons against genotoxic stress via PI3-K/AKT regulated pathway and by suppression of AIF translocation. *Acta Neurobiol Exp.* 69(1):95
- Cipriani G, Rapizzi E, Vannacci A, Rizzuto R, Moroni F, Chiarugi A (2005) Nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-1 rapidly triggers mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem.* 280(17): 17227-34
- Cohausz O, Blenn C, Malanga M, Althaus FR (2008) The role of poly(ADP-ribose)metabolizing enzymes in alkulation-induced cell dath. *Cell. Mol. Life. Sci.* 65; 644-655
- Cohen-Armon M. (2007) PARS-1 activation in the ERK signaling pathway. *Trends Pharmacol Sci.* 28(11): 556-60.
- Craft JM, Watterson DM, Van Eldik LJ (2006) Human amyloid b-induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration. *Glia.* 53; 484-490
- Cregan SP, Dawson VL, Slack RS (2004) Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene.* 23(16): 2785-96
- Culmsee C, Zhu C, Landshamer S, Becattini B, Wagner E, Pellecchia M, Blomgren K, Plešnila N (2005) Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J Neurosci.* 25(44): 10262-10272
- Czapski GA i Storsznajder JB (2008) Białka a stres oksydacyjny. *Mózg a stres*, Kraków 2008. 9-23
- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG (1999) Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulations of nuclear functions. *Biochem J.* 342 (Pt 2); 249-268
- Dahlgren KN, Manelli AM, Blaine Stine, WJ, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJo (2002) Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β peptides differentaially affect neuronal viability. *J Biol Chem.* 277(35); 32046- 32053
- Danial NN (2007) Bcl-2 Family Proteins: Critical Check points of Apoptotic Cell Death *Clin Cancer Res.*13; 7254-7263
- Dantzer F, Amé JC, Schreiber V, Nakamura J, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. *Methods Enzymol.* 409: 493-510.
- David KK, Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL (2009) Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci.* 14:1116-11128
- Davidovic L, Vodenichorov M, Affar EB, Poirier GG (2001) Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp. Cell Res.* 268; 7-13

- Delavallée L, Cabon L, Galán-Malo P, Lorenzo HK, Susin SA **(2011)** AIF-mediated caspase-independent necroptosis: a new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life*. 63(4):221-232
- Delettre C, Yuste VJ, Moubarak RS, Bras M, Robert N, Susin SA **(2006)** Identification and characterization of AIFsh2, a mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) isoform with NADH oxidase activity. *J Biol Chem*. 281(27):18507-18518
- Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK **(2006)** Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*. 26(35):9057-9068
- Dodoni G, Canton M, Petronilli V, Bernardi P, Di Lisa F **(2004)** Induction of the mitochondrial permeability transition by the DNA alkylating agent N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. Sorting cause and consequence of mitochondrial dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 1658:58-63
- Du L, Zhang X, Han YY, Burke NA, Kochanek PM, Watkins SC **(2003)** Intra-mitochondrial poly-ADP ribosylation contributes to NAD⁺ depletion and cell death induced by oxidative stress. *J Biol Chem*. 278: 18426-18433
- Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME **(1997)** Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*. 275: 661-665
- Dyall SC **(2010)** Amyloid-Beta Peptide, Oxidative Stress and Inflammation in Alzheimer's Disease: Potential Neuroprotective Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Int J Alzheimers Dis*. 2010:274128, 1-10
- Dyrks T, Dyrks E, Hartmann T, Masters C, Beyreuther K (1992) Amyloidogenicity of beta A4 and beta A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation. *J Biol Chem*. 267(25):18210-18217
- Ebadi M, Sharma SK. **(2003)** Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*. 5(3):319-335
- Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJ, van Gool WA, Hoozemans JJ. **(2006)** The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 113: 1685-1695
- Eckert A, Steiner B, Marques C, Leutz S, Romig H, Haass C, Muller WE **(2001)** Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation. *J Neurosci Res* 64: 183-192
- Ethier C, Labelle Y, Poirier GG **(2007)** PARS-1-induced cell death through inhibition of the MEK/ERK pathway in MNNG-treated HeLa cells. *Apoptosis*. 12(11):2037-2049
- Ferreira AC, Suriano G, Mendes N, Gomes B, Wen X, Carneiro F, Seruca R, Machado JC. **(2011)** E-cadherin impairment increases cell survival through Notch-dependent up-regulation of Bcl-2. *Hum Mol Genet*. 2011 (on line)

- Fisher AE, Hochegger H, Takeda S, Caldecott KW **(2007)** Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol Cell Biol.* 27(15):5597-5605
- Friess H, Lu Z, Graber HU, Zimmermann A, Adler G, Korc M, Schmid RM, Buchler MW **(1998)** Bax, but not bcl-2, influences the prognosis of human pancreatic cancer. *Gut*, 43, 414-421
- Gange JP, Hunter JM, Labrecque B, Chabot B, Poirier GG **(2003)** A proteomic approach to the identification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as a new family of poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Biochem J.* 371: 331-340
- Genova ML, Bianchi C, Lenaz G **(2005)** Supercomplex organization of the mitochondrial respiratory chain and the role of the Coenzyme Q pool: pathophysiological implications. *Biofactors.* 25; 5-20
- Gibson GL, Allsop D, Austen BM **(2004)** Induction of cellular oxidative stress by the beta-amyloid peptide involved in Alzheimer's disease. *Protein Pept Lett.* 11(3):257-270
- Głód BK, Strosznajder JB **(2001)** Wolne Rodniki w Starzeniu się Mózgu i Innych Proce-sach Biologicznych. *Mózg a Starzenie.* Warszawa 2001, 33-50
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Tablot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J **(1991)** Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 349(6311): 704-706
- Green P, Glozman S, Weiner L, Yavin E **(2001)** Enhanced free radical scavenging and decreased lipid peroxidation in the rat fetal brain after treatment with ethyl docosa-hexaenoate. *Biochim Biophys Acta.* 1532(3): 203-212
- Haass C **(2004)** Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's Amyloid beta-peptide generation. *The EMBO Journal* 23: 483-488
- Hardy JA, Higgins GA **(1992)** Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992 256(5054): 184-185
- Hassa PO i Hottiger MO **(2008)** The diverse biological roles of mammalian PARs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front. Biosci.* 13: 3046-3082
- Hangen E, Blomgren K, Bénit P, Kroemer G, Modjtahedi N **(2010)** Life with or without AIF. *Trends Biochem Sci.* 35(5):278-287
- Hangen E, Kroemer G, Modjtahedi N **(2009)** Vital function of Apoptosis Inducing Factor (AIF). *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench* 2: 66-70
- Heeres JT and Hergentother PJ **(2007)** Poly(ADP-ribose) make date with death. *Current Opinion in Chemical Biology* 11:644-653

Hegedűs C, Lakatos P, Oláh G, Tóth B, Gergely S, Szabó E, Bíró T, Szabó C, Virág L (2008) Protein kinase C protects from DNA damage-induced necrotic cell death by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1. *FEBS Lett.* 582; 1672-1678

Hecker M, Mulsch A, Busse R (1994) Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem.* 62, 1524-1529

Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RM, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen PB, Perry G, Smith MA (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 21:3017-3023

Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL (2004) Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARS-1 and AIF signaling. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 25, 5:259-264

Hottiger MO, Hassa PO, Lüscher B, Schüler H, Koch-Nolte F (2010) Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci.* 35(4):208-219

Hour TC, Shiau SY, Lin JK (1999) Suppression of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine- and S-nitrosoglutathione-induced apoptosis by Bcl-2 through inhibiting glutathione-S-transferase pi in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett.* 110(3):191-202

Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Cuajungco MP, Gray DN, Lim J, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI (1999) The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry.* 38(24):7609-7616

Ishimura R, Martin GR, Ackerman SL (2008) Loss of apoptosis-inducing factor results in cell-type-specific neurogenesis defects. *J Neurosci.* 28(19):4938-4948

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 32: 4693-4697

Joshi A, Bondada V, Geddes JW (2009) Mitochondrial μ -calpain is not involved in the processing of apoptosis inducing-factor. *Exp Neurol.* 218(2): 221-227

Joza N, Oudit GY, Brown D, Bénit P, Kassiri Z, Vahsen N, Benoit L, Patel MM, Nowikovsky K, Vassault A, Backx PH, Wada T, Kroemer G, Rustin P, Penninger JM (2005) Muscle-specific loss of apoptosis-inducing factor leads to mitochondrial dysfunction. Skeletal Muscle Atrophy and Dilated Cardiomyopathy. *Mol. Cell Biol.* 25 (23): 10261-10272

Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Tekahido S, Elia AJ, Cheng H-YM, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong Y-Y, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature.* 410 (6828): 549-554

- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733–736
- Kauppinen TM, Chan WY, Suh SW, Wiggins AK, Huang EJ, Swanson RA (2006) Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(18): 7136-7141
- Kawasaki T, Kitao T, Nakagawa K, Fujisaki H, Takegawa Y, Koda K, Ago Y, Baba A, Matsuda T (2007) Nitric oxide-induced apoptosis in cultured rat astrocytes: protection by edaravone, a radical scavenger. *Glia*. 55(13):1325-33.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300(5618): 486-489
- Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, Muller-Spahn F, Haass C, Czech C, Pradier L, Muller WE (2004) Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J Biol Chem*. 279(48): 50310-50320 (a)
- Keil U, Bonert A, Marquess CA, Strosznajder JB, Muller-Spahn F, Muller WE, Eckert A (2004) Elevated nitric oxide Production mediates β -amyloid-induced mitochondria failure. *Pol J Pharmacol*. 56; 631-634 (b)
- Kilbourn RG, Fonseca GA, Trissel LA, Griffith OW (2000) Strategies to reduce side effects of interleukin-2: evaluation of the antihypertensive agent NG-monomethyl-L-arginine. *Cancer J Sci Am*. Suppl 1:21-30
- Kim HS, Lee JH, Lee PJ, Kim EM, Chang KA, Park CH, Jeong CJ, Wittendrop MC, Seo JH, Choi SH, Suh YH (2002) Amyloid β peptide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. *NeuroReport* 13:1989-1993
- Kim MY, Zhang T, Kraus WL (2005) Poly(ADP-ribosylation) by PARS-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev*. 19(17):1951-67
- King FW, Skeen J, Hay N, Shtivelman E (2004) Inhibition of Chk1b activated PKB/Akt. *Cell Cycle*. 3: 634–637
- Klein JA i Ackerman SL (2003) Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest*. 111(6): 785-793
- Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL (2002) The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419(6905): 367-374
- Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol*. 5(6):834-842
- Kowalczyk E, Kopff A, Kopff M, Fijałkowski P, Błaszczuk J (2005) Tlenek azotu-oksydant czy antyoksydant. *Wiad Lek* 58(9–10): 540–542

- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Qqirion R **(2009)** Apoptosis inducing factor: A matter of neuronal life and death. *Neurobiology*. 81; 179-196
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion E **(2007)** Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. *Progress in Neurobiology*, 81, 179-196
- Kubis AM i Janusz M **(2008)** Choroba Alzheimera – nowe możliwości terapeutyczne oraz stosowane modele eksperymentalne. *Postepy Hig Med. Dosw.* 62; 373-392
- Kubo K, Saito M, Tadokoro T, Maekawa A **(1998)** Dietary docosahexaenoic acid dose not promote lipid peroxidation in rat tissue to the extent expected from peroxidizability index of the lipids. *Biosci Biotechnol Biochem.* 62(9):1698-706
- Kühn K i Lotz M **(2003)** Mechanisms of sodium nitroprusside-induced death in human chondrocytes. *Rheumatol Int.* 23(5):241-247
- LaFerla F M, Green K, Oddo S **(2007)** Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Rev Neurosci.* 8; 499-509
- Laemmli UK **(1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL **(1998)** Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6448-53
- Lampl Y, Boaz M, Gilad R, Lorberboym M, Dabby R, Rapoport A, Anca-Hershkowitz M, Sadeh M **(2007)** Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study. *Neurology.* 69(14):1404-1410
- Leuner K, Hauptmann S, Abdel-Kader R, Scherping I, Keil U, Strosznajder JB, Eckert A, Muller WE **(2007)** Mitochondrial dysfunction: the first domino in brain aging and Alzheimer's disease? *Antioxid Redox Signal.* 9 (10): 1659-1675
- Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH **(2006)** A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440: 352-357
- Love S, Barber R, Wilcock GK **(1999)** Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain.* 122(2): 247-253
- Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD **(1995)** A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science.* 269(5226):970-973
- Lipton SA, Choi YB, Pan Z-H, Lei SZ, Vincent C, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS **(1993)** A redox based mechanism for the neuroprotective effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364; 626-632

- Lukiw WJ i Bazan NG **(2008)** Docosahexaenoic Acid and the Aging Brain. *J Nutr.* 138; 2510–2514
- Markesbery WR **(1997)** Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 23: 134-47
- Markesbery WR i Carney JM **(1999)** Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 9: 133–146
- Mate MJ, Ortiz-Lombardia M, Boitel B, Haouz A, Tello D, Sussin SA, Penninger J, Kroemer G, Alzari PM **(2002)** The crystal structure of the mouse apoptosis inducing-factor AIF. *Nat. Struct. Biol.* 9; 442-446
- Mathis G i Althous FR **(1987)** Release of core DNA from nucleosomal core particles following (ADP-ribose)_n- modification in vitro. *Biochem Biophys Res. Commun.* 143; 1049-1054
- Mattson MP, Goodman Y **(1995)** Different amyloidogenic peptides share a similar mechanism of neurotoxicity involving reactive oxygen species and calcium. *Brain Res.* 676(1):219-224
- Matsumoto K, Akao Y, Yi H, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Naoi M **(2006)** Overexpression of amyloid precursor protein induces susceptibility to oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neural Transm.* 113(2): 125-135
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL **(1999)** Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46: 860-866
- McKenzie M I Ryan MT **(2010)** Assembly factors of human mitochondrial complex I and their defects in disease. *IUBMB Life.* 62(7): 497-502
- Medeiros R, Prediger RD, Passos GF, Pandolfo P, Duarte FS, Franco JL, Dafre AL, Di Giunta G, Figueiredo CP, Takahashi RN, Campos MM, Calixto JB **(2007)** Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J. Neurosci.* 27; 5394–5404
- Minaga T i Kun E **(1983)** Probable helical conformation of poly(ADP-ribose). The effect of cations on spectral properties. *J Biol Chem.* 258; 5726-5730
- Miramar D, Constantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Sussin SA **2001.** NADH oxidase activity 75 of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *The Journal of Biological Chemistry,* 276, 19; 16391-16398
- Mitchell C, Park M, Eulitt P, Yang C, Yacoub A, Dent P **(2010)** Poly(ADP-ribose) polymerase 1 modulates the lethality of **CHK1** inhibitors in carcinoma cells. *Mol Pharmacol.* 78(5):909-917

- Miyamoto Y, Hosotani R, Wada M, Lee J-U, Koshiba T, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, Doi R, Kato M, Shimad Y, Imamura M **(2006)** Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-x and Mcl-1 expression in pancreatic cancer. *Oncology*. 56, 73-82
- Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G **(2006)** Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends in Cell Biology*, 16; 264-272
- Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reversé D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van Leuven F **(1999)** Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem*. 5; 274(10): 6483-6492
- Monaco L, Kolthur-Seetharam U, Loury R, Murcia JM, de Murcia G, Sassone-Corsi P. **(2005)** Inhibition of Aurora-B kinase activity by poly(ADP-ribose)ylation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(40): 14244-8.
- Moreira PI, Santos MS, Moreno A, Rego AC, Oliveira C **(2002)** Effect of amyloid beta-peptide on permeability transition pore: a comparative study. *J Neurosci Res* 69:257-267
- Morimoto Y, Kwon JY, Deyo DJ, Zornow MH **(2002)** Effects of lamotrigine on conditioned learning after global cerebral ischemia in rabbits. *J Anesth*. 16(4):349-53.
- Moroni F **(2008)** Poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP-1) and postischemic brain damage. *Curr Opin Pharmacol*. 8(1):96-103
- Moroni F, Cozzi A, Chiarugi A, Formentini L, Camaioni E, Pellegrini-Giampietro DE, Chen Y, Liang S, Zaleska MM, Gonzales C, Wood A, Pellicciari R **(2011)** Long-lasting neuroprotection and neurological improvement in stroke models with new, potent and brain permeable poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Br J Pharmacol*. Sep 13. (online)
- Moubarak RS, Yuste VJ, Artus C, Bouharrou A, Greer PA, Menissier-de Murcia J, Susin SA **(2007)** Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol. Cell Biol*. 27: 4844-4862
- Murray J, Liu L, Komatsu H, Uryu K, Xiao G, Lawson JA, Axelsen PH **(2007)** Membrane mediated amyloidogenesis and the promotion of oxidative lipid damage by amyloid beta proteins. *J Biol Chem* 282: 9335-9345.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD **(1991)** A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science*. 254(5028):97-99
- Nakamura T, Lipton SA **(2011)** Redox modulation by S-nitrosylation contributes to protein misfolding, mitochondrial dynamics, and neuronal synaptic damage in neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ*. 18(9): 1478-1486 (a)
- Nakamura T, Lipton SA **(2011)** S-nitrosylation of critical protein thiols mediates protein misfolding and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Antioxid Redox Signal*. 14(8): 1479-1492 (b)

- Nakamura T, Lipton SA **(2010)** Redox regulation of mitochondrial fission, protein misfolding, synaptic damage, and neuronal cell death: potential implications for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Apoptosis*. 15(11): 1354-1363
- Naegeli H, Loetscher P, Althaus FR **(1989)** Poly ADP-ribosylation of proteins, processivity of a post-translational modification. *J Biol Chem*. 264(24): 4382-14385
- Niknahad H I O'Brien PJ **(1995)** Cytotoxicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine may involve S-nitrosyl glutathione and nitric oxide. *Xenobiotica* 25;91-101
- Norberg E, Gogvadze V, Ott M, Horn M, Uhlen P, Orrenius S, Zhivotovsky B **(2008)** An increase in intracellular Ca(2+) is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. *Cell. Death Differ*. 15;1857-1864
- Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B **(2010)** Mitochondrial regulation of cell death: Processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 396; 95-10
- Okano J-I, Rustgi K **(2001)** Paclitaxel Induces Prolonged Activation of the Ras/MEK/ERK Pathway Independently of Activating the Programmed Cell Death Machinery. *J Biol Chem*. 276; 19555-19564
- Orsucci D, Mancuso M, Siciliano G **(2008)** Mitochondria, oxidative stress and PARS-1 network: a new target for neuroprotective effects of tetracyclines. *J Physiol*. 586(10):2427-2428
- Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N, Mihara K **(2005)** Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *The EMBO Journal*, 24; 1375-1386
- Parks JK, Smith TS, Trimmer PA, Bennet JP, Parker WD **(2001)** Neurotoxic Abeta peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric oxide synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce mitochondrial permeability transition in vitro. *J Neurochem* 76:1050-1056
- Patric GL **(2001)** *Chemia medyczna* rodz. 7, Warszawa 2001
- Pogrebniak A, Schemainda I, Pelka-Fleischer R, Nussler V, Hasmann M **(2003)** Poly Adp-ribose polymerase (PARP) inhibitors transiently protect leukemia cells from alkylating agent induced cell death by three different effects. *Eur J Med Res*. 8(10); 438-450
- Poitras MF, Koh DW, Yu SW, Andrabi SA, Mandir AS, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM **(2007)** Spatial and functional relationship between poly(ADP-ribose) polymerase-1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the brain. *Neuroscience*. 148(1):198-211
- Porter AG, Urbano AG **(2006)** Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? *Bioessays*. 28(8):834-843.
- Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J **(2006)** Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci*. 26(27): 7212-21

Pytlowany M, Strosznajder JB, Jesko H, Cakala M, Strosznajder RP **(2008)** Molecular mechanism of PC12 cell death evoked by sodium nitroprusside, a nitric oxide donor. *Acta Biochim Pol.* 55 (2): 339-347

Reix S, Mechawar N, Susin SA, Quirion R, Krantic S **(2007)** Expression of cortical and hippocampal apoptosis-inducing factor (AIF) in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28(3); 351-356

Rotem-Dai N, Oberkovitz G, Abu-Ghanem S, Livneh E **(2009)** PKC ϵ confers protection against apoptosis by inhibiting the pro-apoptotic JNK activity in MCF-7 cells. *Exp Cell Res.* 315(15): 2616-2623

Rutkowski R, Pancewicz SA, Rutkowski K, Rutkowska J **(2007)** Znaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w patomechanizmie procesu zapalnego. *Pol. Merk. Lek.* XXIII, 134, 131-136

Saftig P, Peters C, Figura von K, Craessaerts K, Leuven von F, De Strooper B **(1996)** Amyloidogenic Processing of Human Amyloid Precursor Protein in Hippocampal Neurons Devoid of Cathepsin D. *J Biol Chem* 271(44): 27241-27244

Selkoe DJ **(1991)** The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*; 6: 487-498

Selkoe DJ **(1996)** Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271:18295-18298

Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C **(1992)** Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359(6393): 325-7

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL **(2007)** Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- β Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *J Neurosci* 27: 2866-2875

Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ **(2004)** Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta.* 1644(2-3): 107-113

Sheehan JP, Swerdlow RH, Miller SW, Davis RE, Parks JK, Parker WD, Tuttle JB **(1997)** Calcium homeostasis and reactive oxygen species production in cells transformed by mitochondria from individuals with sporadic Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17:4612-4622

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y **(1999)** Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 399(6735): 483-487

Sidorkina O, Espey MG, Miranda KM, Wink DA, Laval J **(2003)** Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase (PARS) by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. *Free Radic Biol Med.* 35: 1431-1438

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

Sisodia SS, Koo EH, Hoffman PN, Perry G, Price DL **(1993)** Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci* 13:3136-3142

Stadtman ER, Levine RL **(1999)** Oxidation of cellular proteins by beta-amyloid peptide. *Neurobiol Aging*. 20(3): 331-333

Stępnik M **(2002)** Molekularne aspekty toksycznego działania tlenku azotu. *Med. Pr.* 52(5): 375-338

Strosznajder JB i Chalimoniuk M **(2001)** Tlenek azotu w starzeniu i chorobach neurodegeneracyjnych. *Mózg a starzenie*, Warszawa 2001. 9-23

Strosznajder JB, Cieslik M, Cakala M, Jesko H, Eckert A, Strosznajder RP **(2011)** Lipoxygenases and poly(ADP-ribose) polymerase in amyloid beta cytotoxicity. *Neurochem Res*. 36(5):839-848

Strosznajder JB, Jeřko H, Strosznajder RP **(2000)** Effect of amyloid beta peptide on poly(ADP-ribose) polymerase activity in adult and aged rat hippocampus. *Acta Biochim Pol.* 47(3):847-854

Strosznajder RP i Banasik M **(2000)** Amyloid beta protein affects poly(ADP-ribose) polymerase activity in PC-12 cells in culture. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 60(2); 215

Strosznajder RP, Czubowicz K, Jesko H, Strosznajder JB **(2010)** Poly(ADP-ribose) metabolism in brain and its role in ischemia pathology. *Mol Neurobiol*. 41(2-3):187-96

Strosznajder RP, Gadamski R, Czapki GA, Jesko H, Strosznajder JB **(2003)** Poly(ADP-ribose) polymerase during reperfusion after transient forebrain ischemia: its role in brain edema and cell death. *J Mol Neurosci*, 20(1);61-72

Strosznajder RP i Gajkowska B **(2006)** Effect of 3-aminobenzamide on Bcl-2, Bax and AIF localization in hippocampal neurons altered by ischemia-reperfusion injury. The immunocytochemical study. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 66 (1): 15-22

Strosznajder RP, Jesko H, Zambrzycka A **(2005)** Poly(ADP-ribose) polymerase. The nuclear target in signal transduction and its role in brain ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol*, 31; 149-167

Suk K, Kim SY, Kim H **(2002)** Essential role of caspase-11 in activation-induced cell death of rat astrocytes. *J Neurochem*. 80(2): 230-238

Suphioglu C, De Mel D, Kumar L, Sadli N, Freestone D, Michalczyk A, Sinclair A, Ackland ML **(2010)** The omega-3 fatty acid, **DHA**, decreases neuronal cell death in association with altered zinc transport. *FEBS Lett*. 584(3):612-618.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Pen-

ninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397; 441-446

Szabo C, Pacher P, Swanson RA (2006) Novel modulators of poly(ADP-ribose) polymerase. *Trends Pharmacol Sci.* 27(12): 626–630

Tao R, Kim SH, Honbo N, Karlner JS, Alano CC (2010) Minocycline protects cardiac myocytes against simulated ischemia–reperfusion injury by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Cardiovasc Pharmacol.* 56(6):659-68.

Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ (2006) Effects of secreted oligomers of amyloid β -protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 572: 477-492

Trajder A i Abramczyk A (2004) Nitroprusydek sodu – w doraźnym obniżaniu ciśnienia tętniczego. *Współczesna analiza leku. Arterial Hypertension* 8 (3); 185-190

Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC (2003) "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory". *Prog. Neurobiol.* 70 (1): 1–32.

Ueda K i Hayashi O (1982) ADP-Ribosylation reactions. *Biology and Medicine. Molecular Biology an International Series of Monographs and Textbooks*

Urbano A , Lakshmanan U, Choo PH, Kwan JC, Ng PY, Guo K, Dhakshinamoorthy S, Porter A. (2005) AIF suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells. *Embo J.* 24; 2815–2826

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* 416: 535-539

Wang H, Yu SW, Koh DW, Lew J, Coombs C, Bowers W, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2004) Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J Neurosci.* 24(48):10963-10973

Wang Y, Dawson VL, Dawson TM (2009) Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: A key event of parthanatos. *Exp Neurol.* 218(2): 193-202(a)

Wang Y, Kim S, Li X, Greer PA, Koehler RC, Dawson VL, Dawson TM (2009) Calpain activation is not required for AIF translocation in PARS-1 dependent cell death (PARTHATOS) *J Neurochem.* 110(2): 687-695 (b)

Wenfeng Yu; Olena Gubkina; Naguib Mechawar; Diana Elwell; Rémi Quirion; Slavica-Krantic (2011) Expression of apoptosis-inducing factor (AIF) in the aged rat brain. *Neurobiol aging.* 32(1):179-80.

Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH (2002) The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 22(5):1858-67.

- Węsierska-Gądek J, Wojciechowski J, Schmid G (2003) Phosphorylation regulates the interaction and complex formation between wt p53 protein and PARS-1. *J Cell Biochem.* 89:1260-1284
- Więckowicz M, Rosińska A, Cichy W (2006) Genotoksyczne substancje występujące w żywności, a ryzyko wystąpienia nowotworów przewodu pokarmowego u człowieka. *Gastroenterologia Polska.* 13(3); 187-191
- Whatcott CJ, Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Jacobson MK (2009) A specific isoform of poly(ADP-ribose) glycohydrolase is targeted to the mitochondrial matrix by a N-terminal mitochondrial targeting sequence. *Exp Cell Res.* 315(20):3477-85
- Wolfe MS, De Los Angeles J, Miller DD, Xia W, Selkoe DJ. (1999) Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 38(35): 11223-11230
- Wyatt MD i Pittman DL (2006) Methylating agent and DNA repair responses: methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol.* 19(12); 1580-1594.
- Vahsen N, Cande C, Briere JJ, Benit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schagger H, Rustin P, Kroemer G (2004) AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *The EMBO Journal,* 23; 4679-4689
- Vahsen N, Candé C, Dupaigne P, Giordanetto F, Kroemer RT, Herker E, Scholz S, Modjtahedi N, Madeo F, Le Cam E, Kroemer G (2006) Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and RNA. *Oncogene* 25(12):1763-1774
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 286(5440): 735-741
- Virág L i Szabó C (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev.* 54(3):375-429
- Yavin E, Brand A, Green P (2002) Docosahexaenoic acid abundance in the brain: a biodevice to combat oxidative stress, *Nutritional Neuroscience.* 5(3): 149-157
- Yrjänheikki J, Koistinaho J, Kettunen M, Kauppinen RA, Appel K, Hüll M, Fiebich BL (2005) Long-term protective effect of atorvastatin in permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1052(2):174-179
- Ye H, Cande C, Stephanous NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H (2002) DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat. Struct. Biol.* 9; 680-684
- Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM (2004) The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol.* 3(12):744-751

- Yu S-W, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL **(2002)** Mediation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1-dependent cell death by Apoptosis-Inducing Factor. *Science*, 297; 259-263
- Yu S-W, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL **(2006)** Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *PNAS*, 103(48); 18314-18319
- Yu W, Mechawar N, Krantic S, Quirion R **(2010)** Evidence for the involvement of apoptosis-inducing factor-mediated caspase-independent neuronal death in Alzheimer disease. *Am J Pathol*. 176(5):2209-2218
- Yung HW, Bal-Price AK, Brown GC, Tolkovsky AM **(2004)** Nitric oxide-induced cell death of cerebrocortical murine astrocytes is mediated through p53- and Bax-dependent pathways. *J Neurochem*. 89(4):812-821
- Zhan Q, Alamo I, Yu K, Boise LH, Cherney B, Tosato G, O'Connor PM, Fornace AJ Jr **(1996)** The apoptosis-associated gamma-ray response of BCL-X(L) depends on normal p53 function. *Oncogene*. 13(10):2287-93
- Zhang TJ, Hang J, Wen DX, Hang YN, i Frederick E. Sieber **(2006)** Hippocampus bcl-2 and bax Expression and Neuronal Apoptosis After Moderate Hypothermic Cardiopulmonary Bypass in Rats. *Anesth Analg*. 102:1018 –1022
- Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH **(1994)** Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose)ynthetase in neurotoxicity. *Science* 263(5147): 687 – 689
- Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H **(2011)** APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. Jan 7;4:3 (online)