

**INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ  
im. MIROŚŁAWA MOSSAKOWSKIEGO  
POLSKA AKADEMIA NAUK**

**ZAKŁAD KOMÓRKOWEJ TRANSDUKCJI SYGNAŁU**

**AGATA ZAMBRZYCKA**

**UDZIAŁ PEPTYDÓW AMYLOIDU BETA W MODULACJI  
PRZEMIAN FOSFOINOZYTYDÓW W MÓZGU.**

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

**WARSZAWA 2002**

***Serdecznie dziękuję Promotorowi niniejszej pracy,  
Pani Profesor Joannie Strosznajder, za pomoc i wsparcie  
udzielone w trakcie pisania rozprawy oraz za opiekę  
naukową podczas całego okresu pracy.***

***Agata Zambrzycka***

**W niniejszej pracy wykorzystano część wyników, które opublikowano w poniższych publikacjach:**

1. JB Strosznajder, **A Zambrzycka** MD Kacprzak (1999) Amyloid beta peptide (25-35) modulates hydrolysis of phosphoinositides by membrane phospholipase(s) C of adult brain cortex. *J. Mol. Neurosci.* 12, 101-109.
2. **A Zambrzycka**, RP Strosznajder and JB Strosznajder (2000) Aggregated amyloid beta peptide 1-40 significantly decreases  $Ca^{2+}$  and cholinergic receptor mediated phosphoinositides degradation by alteration of membrane and cytosolic phospholipase C in brain cortex. *Neurochem. Res.* 25 (2), 189-196.
3. **Zambrzycka A**, Strosznajder JB (2001) Effect of Apolipoprotein E4 and  $A\beta$  25-35 on phosphatidylinositol specific phospholipase C in rat brain. *Folia Neuropathol.* 39 Suppl. A, 45-49.
4. **Zambrzycka A**, Strosznajder JB (2001) Effect of Amyloid beta peptide on cholinergic receptor mediated Poly(ADP-ribose)polymerase activity in rat brain. *Folia Neuropathol.* 39 Suppl. A, 51-54.
5. **Zambrzycka A**, Alberghina M, Strosznajder JB (2002) Effects of aging and amyloid  $\beta$  peptides on choline acetyltransferase activity in rat brain *Neurochem. Res.* 27 (3), 277-281.

<b>I</b>	<b>WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY</b> .....	<b>6</b>
<b>II</b>	<b>WSTĘP</b> .....	<b>9</b>
<b>II.1</b>	<b>Budowa i funkcja peptydów A<math>\beta</math>.</b> .....	<b>9</b>
<b>II.2</b>	<b>Zależna od receptora hydroliza polifosfoinozytidów i udział w przekazywaniu informacji.</b> .....	<b>14</b>
<b>II.3</b>	<b>Enzymy zaangażowane w metabolizm fosfolipidów inozytowych.</b> .....	<b>19</b>
<b>II.3.1</b>	<b>Występowanie, struktura i izoformy fosfolipazy C.</b> .....	<b>19</b>
<b>II.3.1.1</b>	Regulacja PLC $\beta$ . .....	21
<b>II.3.1.2</b>	Regulacja PLC $\gamma$ . .....	22
<b>II.3.1.3</b>	Regulacja PLC $\delta$ . .....	22
<b>II.3.1.4</b>	Regulacja PLC $\epsilon$ . .....	23
<b>II.3.2</b>	<b>Występowanie, struktura i izoformy kinaz fosfolipidów inozytowych.</b> ..	<b>23</b>
<b>II.3.2.1</b>	PI-4kinaza i PIP-5kinaza. ....	23
<b>II.3.2.2</b>	PI-3 kinaza. ....	25
<b>II.4</b>	<b>Wpływ peptydów A<math>\beta</math> na procesy przekaźnictwa informacji na drodze przemian fosfoinozytidów.</b> .....	<b>26</b>
<b>III</b>	<b>ZAŁOŻENIA I CEL PRACY</b> .....	<b>30</b>
<b>IV</b>	<b>MATERIAŁY I METODY</b> .....	<b>33</b>
<b>IV.1</b>	<b>Zwierzęta doświadczalne</b> .....	<b>33</b>
<b>IV.2</b>	<b>Przygotowanie peptydów A<math>\beta</math> i ocena struktury drugorzędowej.</b> .....	<b>33</b>
<b>IV.2.1</b>	Przygotowanie peptydów A $\beta$ . .....	33
<b>IV.2.2</b>	Ocena struktury drugorzędowej peptydów A $\beta$ przy pomocy metody dichroizmu kołowego. ....	33
<b>IV.2.3</b>	Ocena agregacji peptydów A $\beta$ na podstawie elektroforezy na żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących. ....	34
<b>IV.2.4</b>	Ocena fibrylizacji (agregacji) peptydów A $\beta$ przy użyciu tioflawiny-T. ....	35
<b>IV.3</b>	<b>Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz.</b> .....	<b>36</b>
<b>IV.3.1</b>	Preparatyka skrawków. ....	37
<b>IV.3.2</b>	Preparatyka frakcji synaptoneurozomalnej. ....	37
<b>IV.3.3</b>	Preparatyka frakcji synaptozomalnej i cytozolu synaptozomalnego. ....	37
<b>IV.3.4</b>	Przygotowanie homogenatu. ....	38
<b>IV.3.5</b>	Otrzymywanie błon synaptoplazmatycznych i cytozolu z kory mózgu. ....	39
<b>IV.3.6</b>	Preparatyka frakcji jąder komórkowych. ....	39
<b>IV.4</b>	<b>Metody biochemiczne oznaczania aktywności enzymów.</b> .....	<b>40</b>
<b>IV.4.1</b>	Oznaczanie aktywności acetylotransferazy cholinowej (ChAT). ....	40
<b>IV.4.2</b>	Oznaczanie aktywności fosfolipazy C. ....	40
<b>IV.4.2.1</b>	Rozdział rozpuszczalnych w wodzie metabolitów inozytoli przy zastosowaniu chromatografii kolumnowej. ....	41
<b>IV.4.3</b>	Oznaczanie aktywności polimerazy (poli-ADP) rybozy (PARP). ....	42
<b>IV.4.4</b>	Oznaczanie aktywności kinaz fosfolipidów inozytowych: PI-4kinazy i PIP-5kinazy. ....	42
<b>IV.5</b>	<b>Oznaczanie uwalniania kwasu arachidonowego (KA) i diacyloglicerolu (DAG) z błon synaptoplazmatycznych</b> .....	<b>43</b>
<b>IV.5.1</b>	Oznaczanie uwalniania [ $^{14}$ C]KA z egzogenego 1-stearylo-2- [ $^{14}$ C]arachidonylo-fosfatydyloinozytoli przez enzymy błonowe kory mózgu. ....	43
<b>IV.5.2</b>	Ekstrakcja lipidów. ....	44
<b>IV.5.3</b>	Rozdzielanie lipidów. ....	44
<b>IV.6</b>	<b>Immunodetekcja izoform PLC, białek transportujących fosfatydyloinozytol oraz PARP metodą Western blotu</b> .....	<b>44</b>
<b>IV.6.1</b>	Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE). ....	44
<b>IV.6.2</b>	Przenoszenie białek z żelu na błony nitrocelulozowe lub błony PVDF. ....	45

IV.6.3	Analiza immunochemiczna białek.....	45
IV.6.3.1	Analiza immunochemiczna izoform PLC: $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ .....	45
IV.6.3.2	Analiza immunochemiczna białek transportujących PI-TP $\alpha$ .....	46
IV.6.3.3	Analiza immunochemiczna PARP.....	46
<b>IV.7</b>	<b>Ocena ekspresji genu dla PLC<math>\beta</math> metodą hybrydyzacji <i>in situ</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>IV.8</b>	<b>Oznaczanie ekspresji genu syntazy tlenu azotu (NOS) metodą RT-PCR.....</b>	<b>48</b>
IV.8.1	Izolacja RNA z kory mózgu.....	48
IV.8.2	Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	49
IV.8.3	Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR).....	49
<b>IV.9</b>	<b>Badanie wpływu peptydów A<math>\beta</math> na indukcję czynnika proapoptotycznego w synaptozomach.....</b>	<b>50</b>
IV.9.1	Izolacja DNA.....	50
IV.9.2	Elektroforeza DNA na żelu agarozowym.....	51
<b>IV.10</b>	<b>Oznaczanie napływu [<math>^{45}\text{Ca}^{2+}</math>] do synaptoneurozomów i synaptozomów.....</b>	<b>51</b>
<b>IV.11</b>	<b>Badanie poziomu wolnych rodników przy użyciu sondy dichlorofluoresceiny (DCF).....</b>	<b>52</b>
<b>IV.12</b>	<b>Badanie oksydacji lipidów i białek.....</b>	<b>52</b>
IV.12.1	Pomiar stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS).....	52
IV.12.2	Oznaczanie ilości grup karbonylowych w białkach.....	53
<b>IV.13</b>	<b>Inne oznaczenia.....</b>	<b>53</b>
<b>IV.14</b>	<b>Pomiary radioaktywności badanych prób.....</b>	<b>53</b>
<b>IV.15</b>	<b>Statystyczne opracowanie wyników.....</b>	<b>54</b>
<b>V</b>	<b>WYNIKI.....</b>	<b>55</b>
<b>V.1</b>	<b>Regulacja aktywności ChAT. Wpływ A<math>\beta</math> i związków towarzyszących w mózгах dojrzalych i starczych.....</b>	<b>55</b>
<b>V.2</b>	<b>Modyfikacja przez A<math>\beta</math> niezależnej i zależnej od receptora cholinergicznego aktywności PIP<math>_2</math>-PLC i PARP.....</b>	<b>62</b>
V.2.1	Wpływ peptydów A $\beta$ na podstawową i zależną od pobudzenia receptora cholinergicznego i białek G aktywność PLC.....	63
V.2.2	Zależna od pobudzenia receptora cholinergicznego i białek G oraz działania A $\beta$ aktywność PARP.....	69
<b>V.3</b>	<b>Udział A<math>\beta</math> w modulacji PI-PLC w mózгах dojrzalych i starczych.....</b>	<b>77</b>
V.3.1	Efekt A $\beta$ oraz związków towarzyszących na PI-PLC w błonach synaptoplazmatycznych oraz cytozolu z mózгов dojrzalych i starczych.....	77
V.3.2	Aktywność i poziom białka PLC w hipokampie w wyniku działania A $\beta$ i apoE4.....	83
<b>V.4</b>	<b>Charakterystyka działania A<math>\beta</math> na aktywność kinaz fosfoinozytydów i poziom białek transportujących fosfatydyloinozitol.....</b>	<b>86</b>
<b>V.5</b>	<b>Aktywacja procesów wolnorodnikowych i cytozolowego czynnika proapoptotycznego w synaptozomach przez A<math>\beta</math>.....</b>	<b>92</b>
V.5.1	Udział A $\beta$ w uwalnianiu KA i aktywacji procesów wolnorodnikowych w synaptozomach z mózgu szczura dorosłego.....	92
V.5.2	Efekt A $\beta$ na napływ jonów Ca $^{2+}$ oraz na aktywację cytozolowego czynnika w synaptozomach odpowiedzialnego za degradację DNA jądrowego.....	96
<b>VI</b>	<b>DYSKUSJA.....</b>	<b>102</b>
<b>VII</b>	<b>WNIOSKI.....</b>	<b>115</b>
<b>VIII</b>	<b>STRESZCZENIE.....</b>	<b>117</b>
<b>IX</b>	<b>PIŚMIENNICTWO.....</b>	<b>121</b>

**I WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY**

<b>A<math>\beta</math></b>	– peptyd amyloidu beta
<b>Acetylo-CoA</b>	– acetylokoenzym A
<b>Ach</b>	– acetylocholina
<b>AchE</b>	– esteraza acetylocholinowa
<b>ADP</b>	– adenozy-5'-difosforan
<b>Apo</b>	– apolipoproteina
<b>ATP</b>	– adenozy-5'-trifosforan
<b>BACE1</b>	– $\beta$ sekretaza
<b>BAD</b>	– białko proapoptotyczne z rodziny BCL2, należącej do endogennych białkowych regulatorów apoptozy
<b>BCL2</b>	– białko antyapoptotyczne
<b>Białko G</b>	– białko wiążące nukleotydy guaninowe
<b>BSA</b>	– albumina surowicy wołu (frakcja V, pozbawiona kwasów tłuszczowych)
<b>C(83)</b>	– fragment białka APP zawierający 83 aminokwasy powstający w wyniku degradacji APP przez $\alpha$ -sekretazę
<b>C99(100)</b>	– fragment białka APP zawierający 99-100 aminokwasów powstający w wyniku degradacji APP przez $\beta$ -sekretazę
<b>cAMP</b>	– cykliczny adenylozynomonofosforan
<b>cDNA</b>	– DNA komplementarny do mRNA wyprodukowany przez odwrotną transkryptazę
<b>CDP</b>	– cytydynodifosforan
<b>ChA</b>	– choroba Alzheimera
<b>ChAT</b>	– acetylotransferaza cholinowa
<b>CTP</b>	– cytydylotryfosforan
<b>DAG</b>	– diacyloglicerol
<b>DCF</b>	– dichlorofluoresceina
<b>DEPC</b>	– dwuetylopirowęglan
<b>DNA</b>	– kwas deoksyrybonukleinowy
<b>DNPH</b>	– 2,4-dinitrofenylohydrazyna
<b>DTT</b>	– ditiotreitol
<b>ECL</b>	– metoda detekcji chemiluminescencyjnej
<b>EDTA</b>	– kwas etylenodiaminotetraoctowy
<b>EGTA</b>	– kwas etylenoglikotetraoctowy
<b>GAPDH</b>	– dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego
<b>GDP</b>	– guanozynodifosforan
<b>GTP</b>	– guanozynotryfosforan
<b>H<sub>2</sub>DCF-DA</b>	– dichloro-dihydrofluoresceina
<b>H-7</b>	– inhibitor kinaz białkowych o większym powinowactwie do PKC i PKA
<b>H-8</b>	– inhibitor kinaz białkowych o większym powinowactwie do PKA i PKG
<b>H-9</b>	– inhibitor kinaz białkowych o większym powinowactwie do PKG i PKA
<b>HACU</b>	– transport choliny o wysokim powinowactwie do choliny
<b>HEPES</b>	– kwas N-2-hydroksy piperazy-2-etanosulfonowy
<b>iNOS</b>	– indukowalna forma syntazy tlenu azotu

<b>IP<sub>1</sub></b>	– inozytolofoforan
<b>IP<sub>2</sub></b>	– inozytobisfosforan
<b>IP<sub>3</sub></b>	– inozytotrisfosforan
<b>IP<sub>4</sub></b>	– inozytotetrafosforan
<b>IP<sub>5</sub></b>	– inozytopentafosforan
<b>IP<sub>6</sub></b>	– heksakisfosfoinozytol
<b>KA</b>	– kwas arachidonowy
<b>K<sub>ATP</sub></b>	– kanał potasowy zależny od ATP
<b>kDa</b>	– kilodalton, jednostka masy
<b>KF</b>	– kwas fosfatydowy
<b>KRBS</b>	– bufor Krebs-Henseleit
<b>LPI</b>	– lizofosfatydyloinozytol
<b>LTD</b>	– długotrwała depresja synaptyczna
<b>LTP</b>	– długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
<b>M(n)</b>	– receptor muskarynowy układu cholinergicznego, n=1,2,3,4,5
<b>MDA</b>	– aldehyd malonylowy
<b>MG</b>	– monoglicerol
<b>mRNA</b>	– informacyjny RNA
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aza</b>	– pompa sodowo potasowa
<b>NAD</b>	– dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
<b>NFκB</b>	– czynnik transkrypcyjny
<b>NMDA</b>	– kwas N-metylo-D-asparaginianowy
<b>NNLA</b>	– N-nitro-L-arginina
<b>nNOS</b>	– neuronalna forma syntazy tlenku azotu
<b>NO</b>	– tlenek azotu
<b>NOS</b>	– syntaza tlenku azotu
<b>p53</b>	– czynnik transkrypcyjny
<b>PARP</b>	– polimeraza (poli-ADP)rybozy
<b>PBS</b>	– bufor fosforanowy zawierający chlorek sodu
<b>PBS-T</b>	– bufor fosforanowy zawierający chlorek sodu i 0,05% Tween 20
<b>PCR</b>	– łańcuchowa reakcja polimeryzacji
<b>PI</b>	– fosfatydyloinozytol
<b>PI(3)P</b>	– fosfatydyloinozytolo-3-fosforan
<b>PI(3,4)P<sub>2</sub></b>	– fosfatydyloinozytolo-3,4-bisfosforan
<b>PI(3,4,5)P<sub>3</sub></b>	– fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trisfosforan
<b>PI(4)P</b>	– fosfatydyloinozytolo-4-fosforan
<b>PI(4,5)P<sub>2</sub></b>	– fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan
<b>PI-3kinaza</b>	– kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
<b>PI-4kinaza</b>	– kinaza 4-fosfatydyloinozytolu
<b>PIP-5kinaza</b>	– kinaza 5-fosfatydyloinozytolofosforanu
<b>PI-TPα</b>	– izoforma α białka transportującego fosfatydyloinozytol
<b>PKA</b>	– kinaza białkowa zależna od cAMP
<b>PKC</b>	– kinaza białkowa C
<b>PKG</b>	– kinaza białkowa zależna od cGMP
<b>PLA<sub>1</sub></b>	– fosfolipaza A <sub>1</sub>
<b>PLA<sub>2</sub></b>	– fosfolipaza A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	– fosfolipaza C
<b>PLD</b>	– fosfolipaza D

<b>PMSF</b>	– fluorek fenylometanosulfonowy
<b>PVDF</b>	– membrana polivinyłowa
<b>ROS</b>	– reaktywne formy tlenu
<b>RT</b>	– odwrotna transkryptaza
<b>SDS</b>	– sól sodowa kwasu dodecylosulfonowego
<b>SDS-PAGE</b>	– elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących
<b>SOD</b>	– dysmutaza ponadtlenkowa
<b>SPM</b>	– błony synaptoplazmatyczne
<b>SSC</b>	– bufor solny zawierający cytrynian sodu
<b>TBE</b>	– Tris-boran-EDTA
<b>TCA</b>	– kwas trójchlorooctowy
<b>Th-T</b>	– tioflawina T
<b>TLC</b>	– chromatografia płytkowa cienkowarstwowa
<b>TMB-8</b>	– 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna
<b>Tris</b>	– tri(hydroksymetylo)aminometan
<b>Triton X-100</b>	– seria niejonowych detergentów, w których X wskazuje na średnią długość polioksyetylenowego łańcucha, dla Tritonu X-100, wartość X wynosi: 9-10
<b>VACHT</b>	– białko transportujące acetylocholinę do pęcherzyków synaptycznych
<b>βAPP</b>	– białko prekursorowe peptydu amyloidu beta (ang. <i>β Amyloid Precursor Protein</i> )

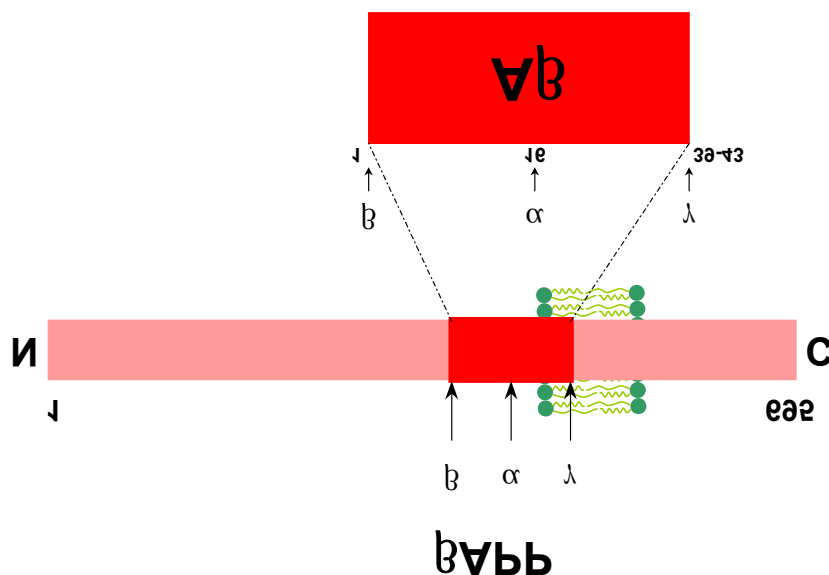


## II WSTĘP

### II.1 Budowa i funkcja peptydów A $\beta$ .

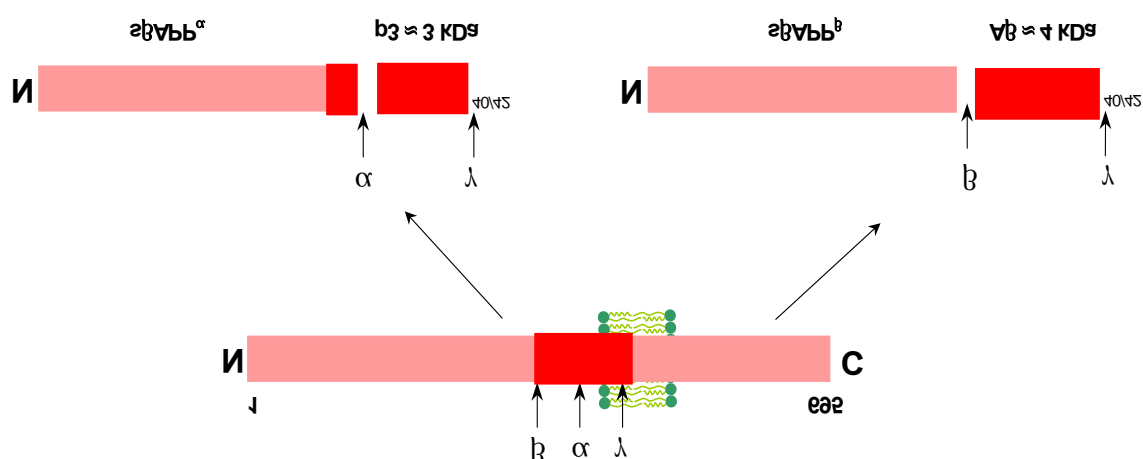
Badania nad amyloidem mają ponad 100-letnią historię. W roku 1851 Virchow po raz pierwszy opisał skrobiopochodną, szklistą substancję o właściwościach zasadowych, nazwaną amyloidem (Virchow, 1851). Późniejsze badania z użyciem technik biochemicznych wykazały, że podstawowym składnikiem amyloidu są niskocząsteczkowe fragmenty białek powstające zazwyczaj z wysokocząsteczkowego białka prekursorowego. Badania kolejnych lat wykazały, że peptydy amyloidu beta (A $\beta$ ) są polipeptydami o masie cząsteczkowej około 4,2 kDa (Glennner i Wong, 1984, Masters i wsp., 1985), zawierają zazwyczaj od 39 do 42/43 aminokwasów. N-końcowa część peptydu obejmująca aminokwasy 1-28 jest hydrofilowa i zawiera aminokwasy obdarzone ładunkiem. C-końcowa część peptydu jest silnie hydrofobowa i obejmuje aminokwasy 29-42/43. N-końcowa domena przybierać może zarówno strukturę drugorzędową typu  $\beta$ , jak i helisy  $\alpha$ , natomiast C-końcowa domena posiada zawsze strukturę typu  $\beta$ -kartki. Na początku lat dziewięćdziesiątych wykazano, że peptydy amyloidu beta powstają w wyniku degradacji białka prekursorowego nazwanego białkiem prekursorowym amyloidu  $\beta$  ( $\beta$ APP) (z ang.  *$\beta$  Amyloid Precursor Protein -  $\beta$ APP*) (Estus i wsp., 1992, Golde i wsp., 1992, Haass i wsp., 1992a). Obecnie wiadomo, że  $\beta$ APP jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 100-140 kDa kodowaną przez gen zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 21. Białko to jest białkiem transbłonowym posiadającym długi zewnątrzkomórkowy fragment N-końcowy, domenę transbłonową oraz krótki, hydrofobowy C-koniec umiejscowiony w cytozolu komórki. Spośród dziesięciu zidentyfikowanych izoform  $\beta$ APP osiem zawiera sekwencję A $\beta$  (Octave, 1995). Głównym białkiem prekursorowym w ośrodkowym układzie nerwowym jest białko zawierające 695 aminokwasów ( $\beta$ APP695), które stanowi około 80% wszystkich transkryptów  $\beta$ APP, a najważniejszym miejscem ekspresji  $\beta$ APP w OUN są komórki nerwowe (Neve i wsp., 1988). Amyloid beta zlokalizowany jest w obrębie domeny zewnątrzkomórkowej (28 aminokwasów) i transbłonowej (11-14 aminokwasów) białka prekursorowego. Uważa się powszechnie, że istnieją dwa główne szlaki kataboliczne  $\beta$ APP, na drodze których mogłyby

powstawać peptydy  $A\beta$ . Jeden z nich nazwany został szlakiem sekrecyjnym, a drugi endosomalno-lizosomalnym. Enzymy odpowiedzialne za proces proteolizy  $\beta$ APP nazwano sekretazami:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  (**Rycina 1**).



**Rycina 1. Metabolizm białka prekursorowego amyloidu beta ( $\beta$ APP) z udziałem sekretaz:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Według Dicksona, 1997.**

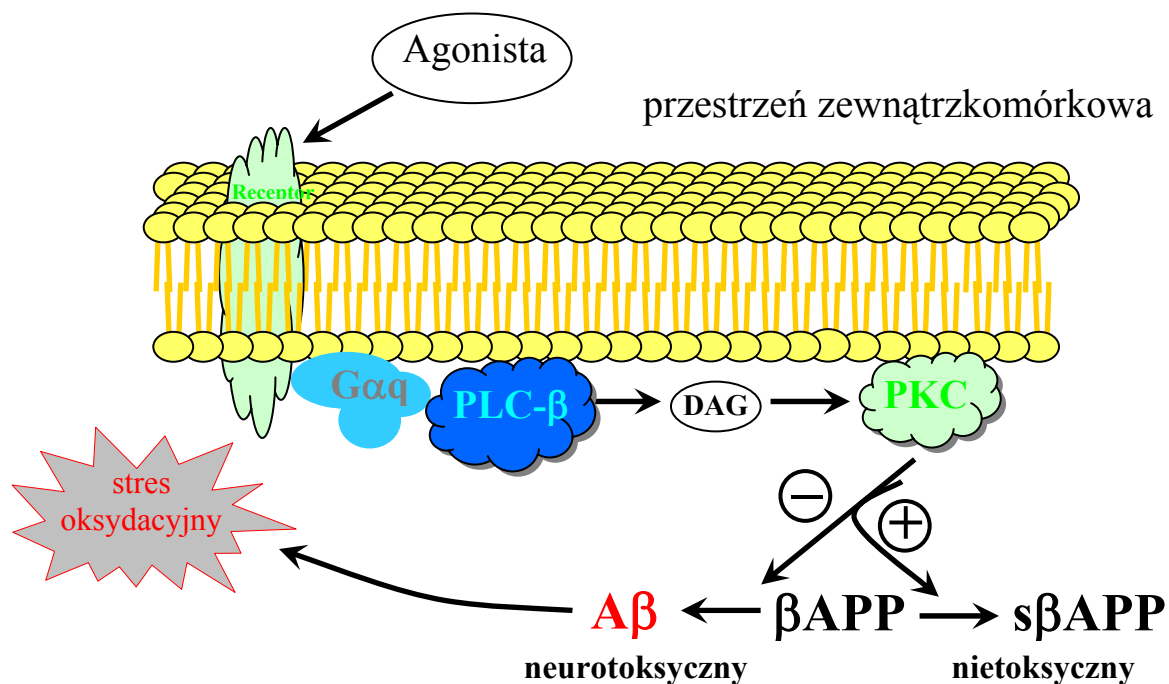
Za szlak przemian prowadzących do powstania peptydów  $A\beta$  uważa się szlak endosomalno-lizosomalny, w którym cząsteczka  $\beta$ APP zostaje najpierw wchłonięta z błony komórkowej i przetransportowana do endosomów i lizosomów, gdzie dalej jest przetwarzana. Na zewnątrzkomórkowym N-końcu cząsteczka  $\beta$ APP jest rozcinana przez  $\beta$ -sekretazę w wyniku czego powstaje długi fragment  $s\beta$ APP oraz C-końcowa domena C 99 (C 100) zawierająca  $A\beta$ . Z kolei fragment C 99 (C 100) ulega degradacji przez  $\gamma$ -sekretazę w wyniku czego uwalniany jest  $A\beta$ , który jest wydzielany na zewnątrz komórki (Estus i wsp., 1992, Golde i wsp., 1992, Haass i wsp., 1992a). Uwalniany jest głównie  $A\beta$  zawierający 40 aminokwasów ( $A\beta$  1-40), a w niewielkim stopniu  $A\beta$  1-42/43. Ta droga degradacji  $\beta$ APP z udziałem  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretazy w wyniku której powstaje  $A\beta$  zwana jest drogą amyloidogenną (**Rycina 2**).



**Rycina 2.** Degradacja  $\beta$ APP przez sekretazę  $\alpha$  i  $\gamma$  na szlaku sekrecyjnym oraz przez sekretazę  $\beta$  i  $\gamma$  na drodze endosomalno-lizosomalnej. Według Dicksona, 1997.

W wyniku działania  $\beta$  i  $\gamma$ -sekretazy cząsteczka  $A\beta$  zostaje uwolniona do przestrzeni pozakomórkowej. W latach 1999-2000 zidentyfikowano oraz poznano strukturę i sekwencję aminokwasową  $\beta$ -sekretazy (BACE 1) (Hussain i wsp., 1999, Sinha i wsp., 1999, Vassar i wsp., 1999, Yan i wsp., 1999, Haniu i wsp., 2000, Pastorino i wsp., 2002). Enzym ten występuje głównie w błonie aparatu Golgiego oraz w niewielkiej ilości w siateczce śródplazmatycznej i błonie plazmatycznej. Uważa się, że za aktywność enzymatyczną tej endopeptydazy odpowiedzialna jest domena transbłonowa (Yan i wsp., 2001).  $\beta$ APP jest katabolizowany również na szlaku nieamyloidogennym z udziałem  $\alpha$ -sekretazy. Ten enzym degraduje  $\beta$ APP wewnątrz sekwencji  $A\beta$  pomiędzy lizyną w pozycji 16 (Lys<sup>16</sup>) i leucyną w pozycji 17 (Leu<sup>17</sup>) w wyniku czego powstaje długi fragment  $s\beta APP_{\alpha}$  zawierający w swoim składzie 16 aminokwasów należących do  $A\beta$  oraz C-koniec zawierający 83 aminokwasy (C 83). C 83 może być degradowany przez  $\gamma$ -sekretazę i prowadzi do uwolnienia fragmentu p3 (**Rycina 2**). Uwalnianie fragmentu  $s\beta APP_{\alpha}$  przez  $\alpha$ -sekretazę stymulowane jest przez kinazę białkową PKC zależną od DAG. Degradacja  $\beta$ APP na szlaku sekrecyjnym przez sekretazę  $\alpha$  i  $\gamma$  ma miejsce w procesie starzenia mózgu, natomiast w mózгах alzheimerowskich peptydy  $A\beta$  miałyby powstawać w wyniku degradacji  $\beta$ APP przez sekretazy  $\beta$  i  $\gamma$  prawdopodobnie na drodze endosomalno-lizosomalnej. Degradacja fosfolipidów inozytolowych w wyniku pobudzenia układu cholinergicznego i aktywacji fosfolipazy

C aktywuje uwalnianie  $s\beta APP_{\alpha}$ , który może mieć działanie troficzne i neuroprotekcyjne (Buxbaum i wsp., 1992, Nitsch i wsp., 1992). Zaburzenie neurotransmisji cholinergicznej i obniżenie aktywności PKC może prowadzić do zaburzenia degradacji  $\beta APP$  na drodze nieamyloidogennej, a w konsekwencji zwiększać uwalnianie  $A\beta$  (Rycina 3).



**Rycina 3. Zależny od pobudzenia receptora cholinergicznego metabolizm  $\beta APP$  i uwalnianie neurotoksycznej formy  $A\beta$ . Według Pacheco i Jope, 1996.**

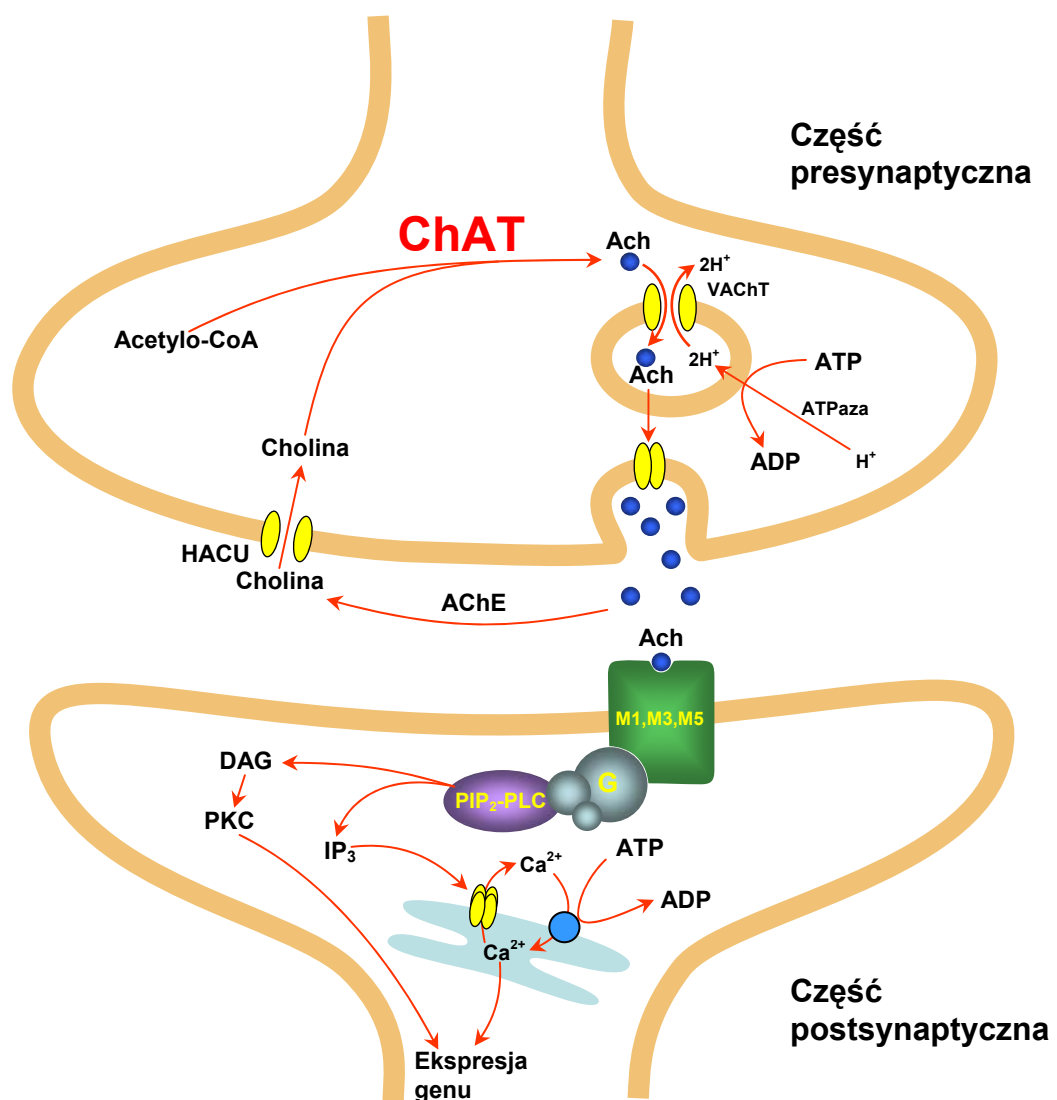
Zależne od PKC uwalnianie  $s\beta APP_{\alpha}$  jest wynikiem odrywania się i transportu pęcherzyków zawierających  $\beta APP$  od aparatu Golgiego i ich transportu do błony plazmatycznej (Xu i wsp., 1995), miejsca aktywności  $\alpha$ -sekreazy (Haass i wsp., 1992b, Sisodia, 1992). Fizjologiczna rola białka prekursorowego amyloidu beta oraz  $A\beta$  jest nadal nieznana. Badania prowadzone w warunkach hodowli tkankowych wykazały, że  $A\beta$  może wywierać na komórki zarówno wpływ troficzny jak i toksyczny. Peptydy  $A\beta_{1-28}$ ,  $A\beta_{1-40}$  oraz  $A\beta_{1-42}$  podawane do hodowli komórkowych w niskich stężeniach 1-5  $\mu M$ , wykazują działanie troficzne (Yankner i wsp., 1990, Whitson i wsp., 1989, Whitson i wsp., 1990). W badaniach *in vitro* przy użyciu peptydów  $A\beta$  w wyższych stężeniach wykazano neurotoksyczne działanie tego peptydu (Yankner i wsp., 1989, Frautschy i wsp., 1991, Kowall i wsp., 1991, Pike i wsp., 1991, Howlett i wsp.,

1995, Diana i wsp., 2000, Wei i wsp., 2000). Toksyczność A $\beta$  jest związana z jego „starzeniem” w wyniku kilkugodzinnej lub kilkudniowej inkubacji, która przyspiesza fibrylizację i agregację peptydu (Pike i wsp., 1991). Na proces fibrylizacji A $\beta$  mogą mieć wpływ następujące czynniki: pH, obecność jonów metali, wolnych rodników, a także białek towarzyszących. Apolipoproteina E może stymulować proces fibrylizacji amyloidu beta, natomiast apolipoproteina J hamować ten proces (Soto, 1996). Jednakże mechanizm neurotoksyczności jest nadal nie wyjaśniony. Sugeruje się, że A $\beta$  zaburza homeostazę wapniową (Mattson i wsp., 1992, 1993a, 1993b), prawdopodobnie przez stymulację napływu jonów wapnia przez kanały wapniowe L i N zależne od potencjału (Davidson i wsp., 1994, Ueda i wsp., 1997, MacManus i wsp., 2000, Samochocki i wsp., 1998) oraz przez receptor NMDA (Hölscher, 1998, Harkany i wsp., 1999). A $\beta$  może również wpływać na depolaryzację błony poprzez obniżenie aktywności Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-azy (Mark i wsp., 1995). Istnieją dane doświadczalne wskazujące na udział reaktywnych form tlenu w toksyczności amyloidu beta (Behl i wsp., 1994, Butterfield i wsp., 1994, Hensley i wsp., 1994, Miranda i wsp., 2000, Varadarajan i wsp., 1999, Butterfield i wsp., 1999). A $\beta$  podawany do mózgu szczura powoduje wzrost produkcji wolnych rodników w sposób zależny od receptora NMDA i syntazy tlenku azotu (Parks i wsp., 2001). Ostatnio wykazano, że A $\beta$  1-40 i 1-42 redukuje jony metali, Fe<sup>3+</sup> oraz Cu<sup>2+</sup> i stymuluje wytwarzanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Huang i wsp., 1999, Yoshiike i wsp., 2001, White i wsp., 2001, Atwood i wsp., 2000, Varadarajan i wsp., 2001). Wykazano, że peptyd ten moduluje aktywność enzymów utrzymujących stan redox komórki na właściwym poziomie, m.in. obniża aktywność katalazy degradującej H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Milton, 1999). Sugeruje się, że peptydy A $\beta$  usuwają z błon dysmutazę ponadtlenkową (SOD) prawdopodobnie poprzez większe powinowactwo do składowych błon z którymi wiąże się SOD i w ten również sposób mają wpływać na aktywację procesów wolnorodnikowych. Badania ostatnich lat wykazały, że A $\beta$  1-42 gromadzący się wewnątrzkomórkowo ma właściwości neurotoksyczne (Ditaranto i wsp., 2001, Kienlen i wsp., 2002, Nagele i wsp., 2002).

## II.2 Zależna od receptora hydroliza polifosfoinozytydów i udział w przekazywaniu informacji.

Pierwsze dane na temat udziału acetylocholiny, agonisty układu cholinergicznego w metabolizmie fosfolipidów inozytolowych pojawiły się w 1953 roku, kiedy to Hokin i Hokin zaobserwowali, że acetylocholina powoduje rozpad, a następnie resyntezę fosfatydyloinozytolu (Hokin i Hokin, 1953). Do chwili obecnej metabolizm fosfoinozytydów oraz zależna od receptora fosfoinozytydowa transdukcja sygnału jest przedmiotem żywych zainteresowań badaczy. Receptory biorące udział w transdukcji sygnału na drodze fosfoinozytydowej związane są ze specyficzną dla fosfoinozytydów fosfolipazą C (PLC) poprzez białka G lub poprzez kinazy tyrozynowe receptorów dla czynników wzrostu. Degradacja fosfolipidów inozytolowych regulowana jest przez szereg układów receptorowych m.in. receptory muskarynowe M1, M3 i M5 układu cholinergicznego, receptory adrenergiczne  $\alpha_{1A}$  i  $\alpha_{1B}$ , receptor histaminowy H<sub>1</sub>, receptory serotonergiczne 5-HT<sub>2</sub> i 5-HT<sub>1C</sub>, receptor purynergiczny P<sub>2</sub> oraz glutamatergiczne receptory metabotropowe (Berridge i Irvine 1984, Fisher i wsp. 1992, Bothmer i Jolles 1994). Udział układu cholinergicznego w degradacji fosfoinozytydów jest kluczowym zjawiskiem w przekazywaniu informacji na tej drodze w mózgu. Neurotransmitter układu cholinergicznego, acetylocholina syntetyzowana jest w zakończeniach nerwowych z acetylokoenzymu A (acetylo-CoA) i choliny przy udziale acetylotransferazy cholinowej (ChAT). Większość efektów ACh w mózgu zachodzi poprzez pobudzenie receptorów muskarynowych. Istnieje 5 typów receptorów muskarynowych od M1 do M5. Receptory M1, M3 i M5 sprzężone są z białkami G niewrażliwymi na toksynę krztuśca i aktywują fosfolipazę C. Receptory M2 i M4 są sprzężone z białkiem G wrażliwym na toksynę krztuśca i hamują aktywność cyklazy adenylanowej oraz aktywują kanały jonowe: potasowy i wapniowy. W wyniku stymulacji cyklazy adenylanowej i syntezy cAMP dochodzi do aktywacji PKA. Wykazano, że PKA zależna od cAMP specyficznie hamuje aktywność PLC $\beta$ 2 regulowaną przez białka G $\beta\gamma$  (Liu i Simon, 1996). Wskazuje to na specyficzne współdziałanie (z ang. „cross-talk”) pomiędzy układem przekazywania informacji zależnym od białek G z udziałem PLC/DAG/PKC, a cAMP/PKA. Drugą grupę receptorów cholinergicznym stanowią jonotropowe receptory nikotynowe. Szybki przepływ jonów

wywołany otwarciem kanału po przyłączeniu agonisty powoduje zmianę potencjału błonowego. Znaczna część tych receptorów to receptory presynaptyczne, które zaangażowane są w uwalnianie neurotransmiterów, m.in., acetylocholino. Działanie acetylocholino kończy się po aktywacji receptora i przekazaniu sygnału do efektorów np. fosfolipazy C. Acetylocholino oddysocjowuje od receptora i rozpada się w reakcji katalizowanej przez esterazę acetylocholinową (E.C.3.1.1.7). Powstała w wyniku hydrolizy cholina jest wychwytywana z przestrzeni międzykomórkowej do zakończenia nerwowego przez system transportu o wysokim powinowactwie wobec choliny (HACU) i ponownie wykorzystywana do syntezy Ach (**Rycina 4**).



**Rycina 4. Neurotransmisja i transdukcja sygnału na drodze cholinergicznej.**

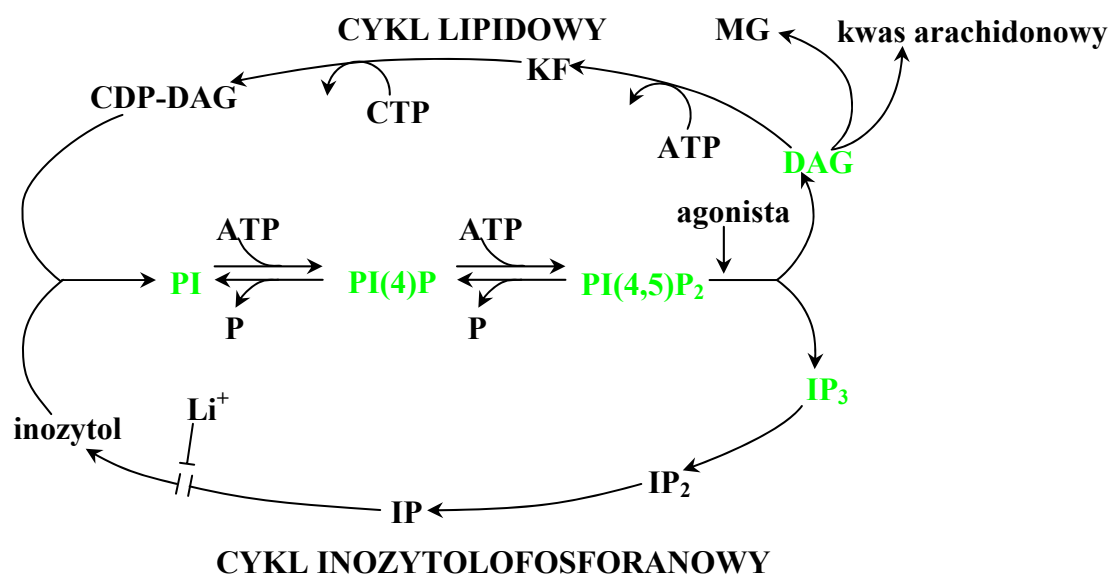
Acetylocholina (ACh) jest syntetyzowana w zakończeniach nerwowych z acetylokoenzymu A (acetylo-CoA) i choliny przy udziale enzymu acetyltransferazy cholinowej (ChAT). Zsyntetyzowana ACh jest transportowana do pęcherzyków

*synaptycznych przez obecne w ich błonie białko transportujące acetylocholinę (VAChT) i tam magazynowana. Po dotarciu potencjału czynnościowego do błony presynaptycznej ACh jest uwalniana do szczeliny synaptycznej na drodze egzocytozy pęcherzyków synaptycznych i aktywuje receptory jonotropowe nikotynowe lub metabotropowe muskarynowe. Pobudzenie tych ostatnich (M1, M3, M5) prowadzi do aktywacji fosfolipazy C beta (PLC $\beta$ ) i uwolnienia wtórnych przekazań informacji: inozytolotrisfosforanu (IP<sub>3</sub>) i diacyloglicerolu (DAG). IP<sub>3</sub> uwalnia wapń z retikulum endoplazmatycznego, a DAG aktywuje kinazę białkową C (PKC). Oba przekazańki poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych wpływają na ekspresję genów. Działanie ACh kończy się z chwilą jej oddysocjowania od receptora i następnie rozpadu w wyniku działania esterazy acetylocholinoiwej (AChE). Powstała w wyniku hydrolizy cholina jest wychwytywana z przestrzeni międzykomórkowej do zakończenia nerwowego przez system transportu o wysokim powinowactwie wobec choliny (HACU) i ponownie wykorzystywana do syntezy ACh.*

W wyniku pobudzenia określonej grupy receptorów i aktywacji PLC (Rhee i Choi 1992, Berridge 1993, Noh i wsp. 1995) dochodzi do degradacji PIP<sub>2</sub>. Fosfolipid ten stanowi poniżej 1% wśród wszystkich fosfolipidów inozytolowych pełni kluczową rolę w przekazywaniu informacji w komórce. W wyniku hydrolizy PIP<sub>2</sub> z udziałem fosfolipazy C powstają dwa wtórne przekazańki informacji, inozytolo-1,4,5-trisfosforan (IP<sub>3</sub>) i diacyloglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> uwalniany jest do cytozolu i wiąże się ze specyficznym receptorem znajdującym się w błonie siateczki śródplazmatycznej, co prowadzi do wyrzutu wapnia z tych magazynów do cytozolu i pociąga za sobą napływ wapnia zewnątrzkomórkowego. Ponadto ostatnie dane wskazują na istotną rolę IP<sub>3</sub> oraz receptora dla IP<sub>3</sub> w regulacji rozwoju neuronów (Mikoshiha, 2001), w ich plastyczności, mitozie i mejozie, (Nishiyama i wsp., 2000), w funkcji cytoszkieletu (Sugiyama i wsp., 2000) i proliferacji komórek (Wang i wsp., 2001). Receptor dla IP<sub>3</sub> typu 1 moduluje mechanizmy plastyczności synaptycznej, wpływa na długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP) i długotrwałą depresję synaptyczną (LTD) (Nishiyama i wsp., 2000, Fujii i wsp., 2000). Receptor dla IP<sub>3</sub> poprzez bezpośrednią interakcję z kanałem wapniowym TRP3 w błonie plazmatycznej moduluje napływ zewnątrzkomórkowego wapnia (Birnbaumer i wsp., 2000). Czas, w którym IP<sub>3</sub> wywołuje mobilizację Ca<sup>2+</sup> jest rzędu sekund. Przekazańnik ten szybko ulega defosforylacji do związków nieaktywnych, a mianowicie do IP<sub>2</sub>, IP i *myo*-inozytolu. IP<sub>3</sub> może być także fosforylowany przez odpowiednią kinazę do inozytolo-1,3,4,5-tetrakisfosforanu (IP<sub>4</sub>). Związek ten działa synergicznie z IP<sub>3</sub> ułatwiając wchodzenie Ca<sup>2+</sup> przez błonę plazmatyczną do wnętrza komórki. IP<sub>4</sub> jest również zdolny do uwalniania Ca<sup>2+</sup> z frakcji mikrosomalnej tkanki nerwowej, działanie jego jest jednak



wielokrotnie słabsze niż  $IP_3$  (Barańska, 1992). Badania ostatnich lat wykazały, że polifosfoinozytole z pięcioma ( $IP_5$ ) i sześcioma ( $IP_6$ ) grupami fosforanowymi pełnią istotną rolę w dynamice pęcherzyków synaptycznych poprzez wiązanie się z białkami presynaptycznymi np. synaptotagminą i mogą brać udział w uwalnianiu neurotransmitterów (Cremona i De Camilli, 2001, Saiardi i wsp., 2000). Drugim wtórnym przekaźnikiem informacji w komórce powstałym w wyniku hydrolizy fosfolipidów inozytolowych jest diacyloglicerol (DAG). Związek ten zwiększa powinowactwo kinazy białkowej C wobec wapnia, co powoduje jej pełną aktywność już w fizjologicznych stężeniach tego jonu. DAG podobnie jak  $IP_3$  jest natychmiast metabolizowany, przy udziale DAG-kinazy ulega fosforylacji do kwasu fosfatydowego (KF), który inicjuje resyntezę fosfatydyloinozytolu. KF reaguje z CTP, a powstały z niego CDP-diacyloglicerol reaguje z *myo*-inozytolem powstałym w wyniku kolejnych defosforylacji  $IP_3$ . W wyniku tej reakcji powstaje fosfatydyloinozytol, który jest transportowany do błony plazmatycznej i fosforylowany przez kinazy do  $PIP_2$ , w ten sposób cykl lipidowy się zamyka (Rycina 5).



**Rycina 5. Szlaki przekształceń metabolicznych wtórnych przekaźników informacji: diacyloglicerolu (DAG) i inozytolotrisfosforanu ( $IP_3$ ). Według: Berridge i Irvine, 1984.**

Powstały pod wpływem agonisty inozytolotrisfosforan ( $IP_3$ ) ulega w tzw. cyklu inozytołofosforanowym kolejnym degradacjom aż do powstania inozytolu. Diacyloglicerol (DAG) wchodzi natomiast w cykl tzw. przekształceń lipidowych. W wyniku fosforylacji powstaje z niego kwas fosfatydowy (KF), który reaguje z CTP. Powstały CDP-diacyloglicerol (CDP-DG) reaguje z inozytolem tworząc

*fosfatydyloinozytol (PI). W wyniku kolejnych fosforylacji z fosfolipidu tego powstaje fosfatydyloinozytolo-4-fosforan (PI(4)P) i fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PI(4,5)P<sub>2</sub>). Odszczepienie od DG kwasu arachidonowego (przez fosfolipazę A<sub>2</sub>) prowadzi do powstania monoglicerołu (MG).*

Fosfatydyloinozytol może być również degradowany przy udziale fosfolipazy A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) do lizofosfatydyloinozytolu (LPI) i kwasu arachidonowego (KA) oraz przez fosfolipazę A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) z uwolnieniem LPI i kwasu stearynowego. LPI może być z kolei degradowany przez lizofosfolipazę do glicerofosfoinozytolu i kwasu arachidonowego. Kwas arachidonowy może być również uwalniany w wyniku hydrolizy DAG przez DAG-lipazę oraz może być uwalniany z KF w wyniku działania PLA<sub>2</sub>. Degradacja PIP<sub>2</sub> przez fosfolipazę C i uwolnienie IP<sub>3</sub>, a w konsekwencji wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu Ca<sup>2+</sup> prowadzi do aktywacji fosfolipazy C degradującej PI i PIP. W wyniku degradacji tych lipidów powstaje DAG przez co zwiększa się jego pula w komórce i przekazywany sygnał jest podtrzymywany. Oba wtórne przekaźniki informacji DAG i IP<sub>3</sub> prowadzą do fosforylacji białek, a w konsekwencji do ekspresji genów. Ostatnie badania (Homburg i wsp., 2000, Zambrzycka i Strosznajder, 2001) wskazują, że IP<sub>3</sub> pośredniczy w przekazywaniu informacji do enzymu jądrowego poli(ADP-rybozo)polimerazy (PARP). Zgodnie z najnowszymi danymi enzym ten poprzez interakcję z czynnikami transkrypcyjnymi może odgrywać istotną rolę w ekspresji genów (Kannan i wsp., 1999, Butler i Ordahl, 1999, Hassa i Hottiger, 1999). Badania ostatnich lat wykazały, że fosfoinozytydy i ich metabolizm związany jest z regulacją licznych istotnych funkcji komórki. PIP<sub>2</sub> reguluje funkcje kanału potasowego zależnego od ATP (K<sub>ATP</sub>) w błonie komórkowej (Ashcroft, 1998) i wpływa na właściwe funkcjonowanie cytoszkieletu. Poprzez interakcje ze specyficznymi białkami PIP<sub>2</sub> reguluje proces egzo- i endocytozy oraz funkcje metabotropowych i jonotropowych receptorów postsynaptycznych w tym receptora NMDA (Osborne i wsp., 2001). PLC, poza tym, że jest kluczowym enzymem w metabolizmie fosfoinozytydów pełni istotne funkcje fizjologiczne. PLCβ1 reguluje kształtowanie i rozwój kory mózgowej, wpływa na plastyczność neuronów (Kind i wsp., 1997, Hannan i wsp., 2001, Blakemore 2001, Weeber i wsp., 2001). PLCδ4 reguluje reakcję akrosomalną w procesie zapłodnienia (Fukami i wsp., 2001), pełni istotną funkcję w regulacji cyklu komórkowego, a głównie w fazie wzrostu komórki. W ostatnim dziesięcioleciu odkryto obecność fosfoinozytydów w jądrze komórkowym. PLC bierze udział w funkcji jądra

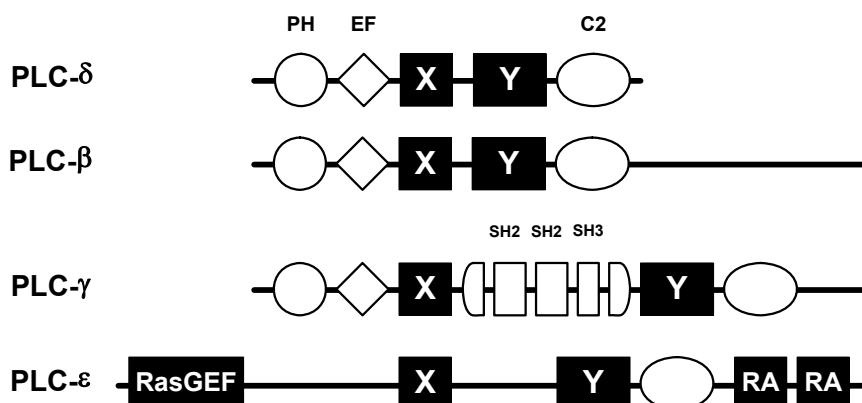
komórkowego, ekspresji genów i syntezie DNA. Inozytolofosforany wpływają na ekspresję genów oraz transport mRNA z jądra komórki (Odom i wsp., 2000, Chi i Crabtree, 2000). Zwrócono też uwagę na polifosfoinozytydy ufosforylowane w pozycji 3 pierścienia inozytowego, które nie są substratami dla PLC, a w ich syntezie bierze udział PI-3kinaza. Ta grupa fosfolipidów również uczestniczy w transdukcji sygnału (Payraastre i wsp., 2001) oraz w transporcie wewnątrzkomórkowym i regulacji pęcherzyków synaptycznych (Corvera i wsp., 1999, Simonsen i wsp., 2001). Jednakże do chwili obecnej nie wiadomo jaka jest funkcja licznych inozytolofosforanów w komórce i w jądrze komórkowym gdzie cykl fosfoinozytydowy nie jest w pełni poznany.

## **II.3 Enzymy zaangażowane w metabolizm fosfolipidów inozytowych.**

### **II.3.1 Występowanie, struktura i izoformy fosfolipazy C.**

Badania Hokin'a (Hokin i Hokin, 1953) i późniejsze badania Michell'a (Michell, 1975) wykazały, że fosfolipaza C (PLC) jest kluczowym enzymem w zależnej od agonistów degradacji fosfoinozytydów i mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego. W późnych latach osiemdziesiątych i na początku lat dziewięćdziesiątych zidentyfikowano i wyizolowano trzy podtypy PLC:  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  oraz zsekwencjonowano cDNA dla tych izoform (Rhee i Choi, 1992). W 2001 roku zidentyfikowano kolejną izoformę fosfolipazy C, izoformę  $\epsilon$  o masie cząsteczkowej 230-260kDa (Rhee, 2001). Izofomy PLC  $\beta$  mają masę molekularną 155kDa, izofomy  $\gamma$  i  $\delta$  odpowiednio 145kDa i 85kDa. U ssaków zidentyfikowano cztery izofomy  $\beta$ , dwie izofomy  $\gamma$  oraz cztery izofomy  $\delta$ . Enzymy opisane u drożdży, grzybów oraz roślin wykazują strukturę izofomy delta wskazując, że jest to najstarsza filogenetycznie forma. Formy beta i gamma wyewoluowały później, po wyodrębnieniu się królestwa grzybów, roślin i zwierząt około 940 milionów lat temu (Koyanagi i wsp. 1998). Enzymy te są pojedynczymi polipeptydami, w których zidentyfikowano i scharakteryzowano liczne domeny funkcjonalne. Centralną część polipeptydu stanowi wysoce konserwatywna domena katalityczna X/Y wokół której zlokalizowane są pozostałe domeny: leżąca na

N-końcu domena PH, następnie domena z motywem dłoni EF oraz C-końcowa domena C2 leżąca bezpośrednio za regionem Y (**Rycina 6**).



**Rycina 6. Struktura izoform fosfolipazy C.** Na schemacie zaznaczono domeny katalityczne X i Y, oraz domenę PH, EF, C2, SH2, SH3, RasGEF i RA.

Region X domeny katalitycznej zbudowany jest ze 147 aminokwasów, a region Y zawiera 118 reszt aminokwasowych. Do centrum aktywnego znajdującego się w tej domenie wiązane są jony wapnia. Domena PH zawierająca 100 aminokwasów nie posiada właściwości katalitycznych, natomiast poprzez specyficzne wiązanie do polifosfoinozytydów odpowiedzialna jest za przytwierdzenie enzymu do wewnętrznej powierzchni membrany, domena PH wiąże się też z podjednostką  $\beta/\gamma$  białka G. Większość fosfolipaz C u *Eucariota* zawiera pojedyncze domeny PH. Dodatkowe regiony PH występują w izoformie  $\gamma 1$  i  $\gamma 2$ , które oddzielają domeny SH w regionie X/Y. Funkcja domeny EF jest nadal nie poznana, sugeruje się, że jest ona swego rodzaju elastycznym łącznikiem między domeną PH, a pozostałą częścią enzymu. Domena C2 zawierająca około 120 aminokwasów ma zdolność wiązania trzech jonów wapnia i jest odpowiedzialna za właściwą orientację centrum katalitycznego enzymu w stosunku do powierzchni membrany. Izoformy  $\beta$  posiadają dodatkową domenę C-końcową leżącą bezpośrednio za domeną C2. Jest to fragment o 400 aminokwasach, który zawiera sekwencje istotne w wiązaniu enzymu do błony komórkowej, lokalizacji w jądrze komórkowym i aktywacji tej izoformy przez białka G. Usunięcie tego

fragmentu z PLC $\beta$  nie usuwa właściwości katalitycznych enzymu, ale znosi jego aktywację przez białka G.

### II.3.1.1 Regulacja PLC $\beta$ .

U ssaków zidentyfikowano cztery izoformy PLC $\beta$ :  $\beta$ 1 -  $\beta$ 4. PLC  $\beta$ 1 jest najobficiej reprezentowana w mózgu (Suh i wsp., 1988, Rebecchi i Pentyala, 2000) występuje głównie w neuronach piramidalnych hipokampa, w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego oraz w jądrach wzgórza (Rebecchi i Pentyala, 2000). Pozostałe izoformy PLC $\beta$ 3 i PLC $\beta$ 4 bogato są reprezentowane w mózdzku i siatkówce. Isoformy PLC $\beta$  regulowane są przez białka G, które stanowią rodzinę homologicznych białek trójpodjednostkowych, zbudowanych z podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  i odgrywają rolę pośredników, przenosząc sygnał poprzez błonę komórkową od receptora do efektor. Pierwsze białko G zostało odkryte i wyizolowane w latach 70-tych przez fizjologa amerykańskiego A.G. Gilmana, który w roku 1994 otrzymał Nagrodę Nobla za badania w tej dziedzinie. Cechą charakterystyczną białek G jest regulacja ich działania przez nukleotydy guanylowe, GTP-„włączający” i GDP-„wyłączający” system informacji. Chociaż wiadomo, że domena PH PLC $\beta$  jest odpowiedzialna za wiązanie enzymu do białek G molekularne mechanizmy rządzące jej aktywacją są nadal nie wyjaśnione. Isoformy fosfolipazy C  $\beta$  są aktywowane zarówno przez podjednostkę  $\alpha$  jak też kompleks  $\beta/\gamma$  białek G (Exton, 1996, Singer i wsp., 1996). Białka G dzielą się na cztery podstawowe rodziny:  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  i  $G_{12}$ . W regulację fosfolipazy C  $\beta$  zaangażowane są białka G z rodziny  $G_q$ , podjednostki  $\alpha_q$  i  $\alpha_{11}$ , jednak poszczególne izoformy PLC $\beta$  wykazują różny stopień wrażliwości na te białka. Ostatnio zidentyfikowano PLC $\beta$ 4, która jest nie wrażliwa na  $\alpha_q$ , (Kim i wsp., 1998). Isoformy PLC $\beta$ 2 i  $\beta$ 3 są regulowane głównie przez podjednostki  $\beta/\gamma$  (Park i wsp., 1993), podczas gdy PLC $\beta$ 1 jest stymulowana przez te podjednostki w niewielkim stopniu (Camps i wsp., 1992), a PLC $\beta$ 4 jest całkowicie niewrażliwa na kompleks  $\beta/\gamma$  (Lee i wsp., 1994). Chociaż region PLC $\beta$  odpowiedzialny za interakcję enzymu z białkami G jest zidentyfikowany, molekularne mechanizmy aktywacji przez białka G są nadal nie wyjaśnione (Jenco i wsp., 1997, Morris i Scarlata, 1997).

### II.3.1.2 Regulacja PLC $\gamma$ .

Zidentyfikowano dwie izoformy tego enzymu: PLC $\gamma$ 1 i PLC $\gamma$ 2. Są one nierównomiernie rozmieszczone w mózgu. Poziom mRNA PLC $\gamma$ 1 jest najwyższy w neuronach, następnie oligodendrocytach i astrocytach (Mizuguchi i wsp., 1991). Wysoki poziom mRNA tej izoformy obserwuje się w korze mózgu u embrionów (Ross i wsp., 1989), a także w hipokampie, opuszce węchowej oraz w mózdzku. PLC $\gamma$ 2 występuje głównie w komórkach Purkinjego oraz w komórkach ziarnistych mózdzku (Tanaka i Kondo, 1994). PLC $\gamma$  jest regulowana przez kinazy tyrozynowe związane z receptorami czynników wzrostu. Po związaniu liganda do receptora następuje zmiana konformacyjna w części zewnątrzkomórkowej receptora i oligomeryzacja receptorów, co umożliwia interakcje między domenami cytoplazmatycznymi sąsiadujących receptorów i autofosforylację kinaz tyrozynowych będących integralną częścią receptorów. W wyniku autofosforylacji receptora powstają miejsca wiążące dla domen SH2, które rozpoznają swoiście fosfotyrozynę. PLC $\gamma$ , która zawiera w swoim składzie dwie domeny SH2 przemieszcza się do błony komórkowej, gdzie jest fosforylowana na tyrozynie przez kinazę tyrozynową. Powoduje to stymulację aktywności i degradację fosfatydyloinozytoli. Izofорма PLC $\gamma$ 1 jest ponadto fosforylowana przez PKA i PKC na serynie w pozycji 1248 oraz na treoninie, to prowadzi jednak do obniżenia aktywności enzymu. PLC $\gamma$  jest również modulowana przez białka związane z aktyną, m.in. profilinę i gelsolinę, które wiążą się z PIP<sub>2</sub> i hamują aktywność PLC. Aktywatorem PLC $\gamma$  jest PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Lipid ten łączy się bezpośrednio z N-końcową domeną PH oraz C-końcową domeną SH2 enzymu i umożliwia wiązanie cząsteczki do powierzchni membrany, aktywując w ten sposób PLC $\gamma$  nawet przy braku fosforylacji na tyrozynie (Bae i wsp., 1998). Nienasycone kwasy tłuszczowe, w tym kwas arachidonowy również stymulują aktywność PLC $\gamma$  (Sekiya i wsp., 1999).

### II.3.1.3 Regulacja PLC $\delta$ .

Zidentyfikowano cztery izoformy PLC $\delta$ :  $\delta$ 1 –  $\delta$ 4, u ssaków najobficiej reprezentowana jest PLC $\delta$ 1, chociaż jej poziom jest stosunkowo niski w porównaniu do izoformy  $\beta$  i  $\gamma$ . W mózgu szczurzym PLC $\delta$ 1 jest zlokalizowana głównie w komórkach astrogleju, a w mniejszym stopniu w neuronach (Choi i wsp., 1989, Mizuguchi i wsp.,

1991). Izoforma ta jest głównie formą cytozolową. W przeciwieństwie do pozostałych izoform PLC $\delta$ 1 nie jest regulowana przez fosforylację ani też przez podjednostki białek G. PLC $\delta$  jest regulowana przez odkryte w ostatnich latach białko G: G<sub>h</sub>. Białko to posiada aktywność transglutaminazy, ale nie jest zaangażowane w regulację PLC $\beta$  (Murthy i wsp., 1999). Ponadto enzym ten odznacza się wysoką wrażliwością na jony wapnia, jest aktywowany w obecności cytozolowych stężeń jonów wapnia: 10<sup>-7</sup> do 10<sup>-5</sup> M. Stymulacja wapniem tej formy PLC $\delta$  wywołuje około 100-krotnie wyższą aktywność specyficzną w stosunku do izoform  $\beta$  i  $\gamma$ . Czy pozostałe izoformy PLC $\delta$  są regulowane podobnie nie wiadomo. Mechanizmy regulujące aktywność izoenzymów PLC $\delta$  oraz ich znaczenie biologiczne pozostają nadal niewyjaśnione.

#### **II.3.1.4 Regulacja PLC $\epsilon$ .**

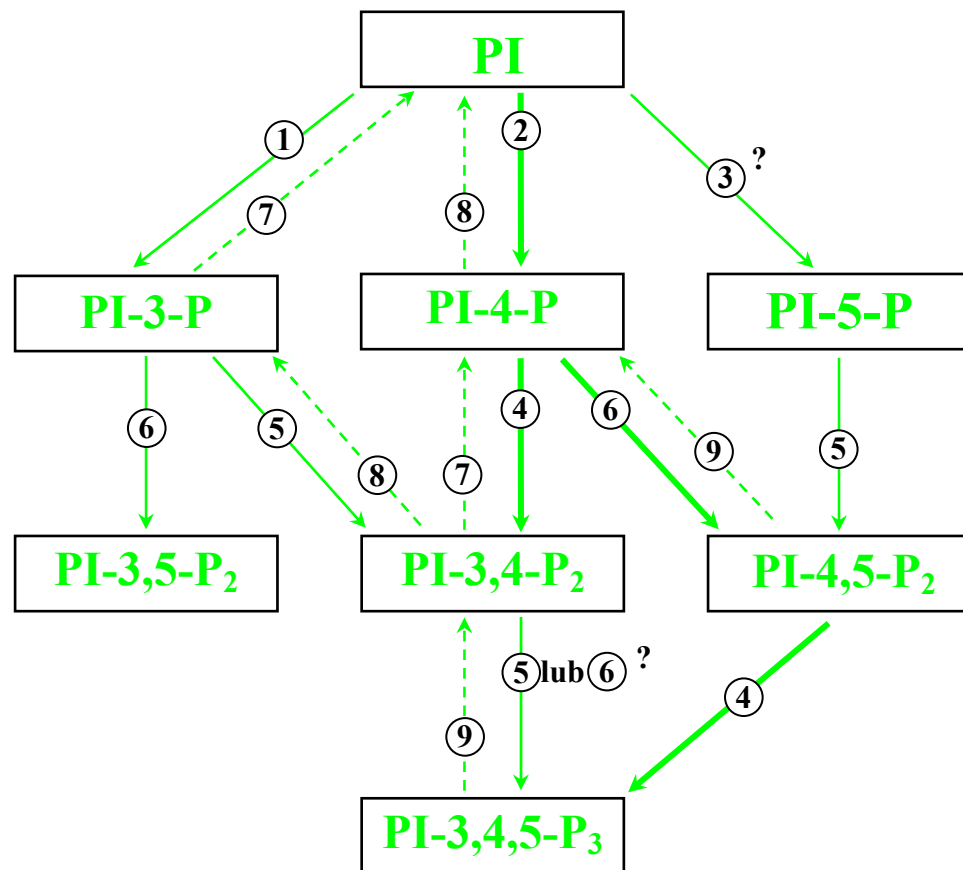
Zidentyfikowana w ostatnich latach PLC- $\epsilon$  szczególnie obficie występuje w komórkach mięśnia sercowego. Opisano dwie formy tego enzymu, o masie molekularnej 260kDa i 230kDa (Lopez i wsp., 2001, Song i wsp., 2001). Obie formy poza domeną katalityczną X/Y oraz domeną regulatorową C2 posiadają dodatkowe domeny, N-końcową domenę RasGEF i C-końcową domenę RA, które są specyficzne tylko dla tej formy enzymu. Ta fosfolipaza C nie posiada domeny PH i domeny EF. PLC- $\epsilon$  jest regulowana przez małe białka G, białka Ras, domena RA enzymu wiąże się z białkiem Ras i enzym translokuje się z cytozolu do błony komórkowej. Czynniki wzrostowe również aktywują tę formę enzymu. Ponadto białko G $\alpha_{12}$  aktywuje PLC- $\epsilon$ . Dotychczas niewiele jednak wiadomo na temat mechanizmów rządzących regulacją tej nowej formy fosfolipazy C.

### **II.3.2 Występowanie, struktura i izoformy kinaz fosfolipidów inozytowych.**

#### **II.3.2.1 PI-4kinaza i PIP-5kinaza.**

Okolo 5-10% pula fosfatydyloinozytolu występującego w komórce jest ufosforylowana w jednej lub kilku pozycjach pierścienia inozytowego. W wyniku

fosforylacji PI powstają odpowiednio: PI4P, PI4,5P<sub>2</sub>, PI3P, PI3,4P<sub>2</sub> i PI3,4,5P<sub>3</sub> (Rycina 7).



**Rycina 7. Synteza fosfoinozytydów.**

1- PI-3kinaza (typ III); 2- PI-4kinaza; 3- PI-5kinaza; 4- PI-3kinaza (typ I lub II); 5- PI(5)P-4kinaza; 6- PI(4)P-5kinaza; 7- 3-fosfataza; 8- 4-fosfataza; 9- 5-fosfataza;

PI4P jest produkowany przez PI-4kinazę, który następnie może być fosforylowany przez PI-5kinazę w wyniku czego powstaje PI4,5P<sub>2</sub>, który jest prekursorem wtórnych przekaźników informacji DAG i IP<sub>3</sub>. PI-4kinaza jest formą głównie błonową, występuje w błonie plazmatycznej jak też w błonach wewnątrzkomórkowych: jądrowej, lizosomalnej, aparatu Golgiego i siateczki śródplazmatycznej (Carpenter i Cantley 1996, Pike, 1992, Olsson i wsp., 1999). Badania ostatnich lat wykazały obecność PI-4kinazy w jądrze komórkowym oraz istotną rolę tego enzymu w procesach jądrowych (deGraaf i wsp., 2002). Oczyszczono i scharakteryzowano dwa typy PI-4kinazy: II i III. Klasyfikacja ta jest oparta na podstawie jego wrażliwości na detergent i adenozyne. PI-



4kinaza typu II o masie cząsteczkowej 55kDa jest formą związaną z błonami, jej aktywność jest hamowana przez adenozyne i stymulowana przez detergent. Typ III PI-4kinazy o masie 230kDa jest mniej wrażliwy na adenozyne i aktywację detergentem. Regulacja aktywności tego enzymu nie jest w pełni wyjaśniona. PIP-5kinaza, która katalizuje fosforylację PIP w pozycji 5 pierścienia inozytolowego jest formą głównie cytozoolową, niewielka pula występuje również w błonach plazmatycznych, szczególnie obficie jest reprezentowana w zakończeniach synaptycznych. Forma cytozoolowa ma masę 100-110 kDa. Podobnie jak w przypadku PI-4 kinazy regulacja tego enzymu nie jest dokładnie poznana.

### II.3.2.2 PI-3 kinaza.

Metabolizm fosfolipidów inozytolowych okazał się bardziej skomplikowany z chwilą odkrycia fosfolipidów inozytolowych ufosforylowanych w pozycji 3 pierścienia inozytolowego. Reakcję tę prowadzi 3 kinaza fosfatydyloinozytolowa (PI-3kinaza). W wyniku działania poszczególnych izoform tego enzymu powstają polifosfoinozytydy należące do nowej klasy fosfolipidów inozytolowych z grupą fosforanową w pozycji 3 pierścienia inozytolowego, należą do nich fosfatydyloinozytolo(3)fosforan (PIP), dwa podwójnie ufosforylowane fosfolipidy, fosfatydyloinozytolo(3,4)bisfosforan i fosfatydyloinozytolo(3,5)bisfosforan (PIP<sub>2</sub>) oraz potrójnie ufosforylowany fosfatydyloinozytolo(3,4,5)trisfosforan (PIP<sub>3</sub>). Związki te nie są substratami dla fosfolipazy C, ale podobnie jak produkty fosfolipazy C są wtórnymi przekaźnikami informacji (Toker i Cantley, 1997). Ich znaczenie biologiczne nie jest jeszcze w pełni wyjaśnione, wiadomo jednak, że pełnią istotną rolę w proliferacji komórek, zmianie kształtu, czynnościach wydzielniczych, transporcie glukozy, regulacji funkcji cytoszkieletu i aktywności fosfolipazy C $\gamma$  (Ptasznik i wsp., 1997, Falasca i wsp., 1998, Pan i wsp., 1999, Yudowski i wsp., 2000, Hsu i wsp., 2000, Lee i wsp., 2001). Uważa się, że PI-3 kinaza pełni istotną rolę w regulacji procesu apoptozy poprzez regulację fosforylacji białka proapoptotycznego BAD, bądź też wpływa na ekspresję antyapoptotycznego białka BCL2. Produkty PI-3kinazy zostały po raz pierwszy zidentyfikowane i wyizolowane w neutrofilach w 1988 roku. Od tego momentu zaczęła się cała seria odkryć dotycząca PI-3 kinazy i jej produktów. Obecnie enzym ten jest już oczyszczony i poznana jest jego budowa. PI-3 kinaza stanowi całą grupę spokrewnionych ze sobą enzymów, do chwili obecnej wyizolowano 9 różnych izoform

tego enzymu. Klasyczna forma PI-3kinazy składa się z dwóch połączonych ze sobą polipeptydów. Jeden, o masie cząsteczkowej 85 kDa, pełni funkcje regulatorowe i łączy się z receptorem. Drugi o masie cząsteczkowej 110 kDa, pełni funkcje katalityczne i prowadzi reakcję fosforylacji fosfolipidów inozytolowych wprowadzając grupę fosforanową w pozycję 3 pierścienia inozytowego. PI-3kinaza posiada w jednostce regulatorowej grupę SH2, która ma zdolność wiązania się z receptorami posiadającymi aktywność kinazy tyrozynowej. Enzym jest aktywowany poprzez fosforylację na tyrozynie, w wyniku bezpośredniej interakcji z receptorem posiadającym w swojej cząsteczce kinazę tyrozynową. Poza regulacją przez kinazy tyrozynowe związane z receptorami czynników wzrostu PI-3 kinaza może być regulowana przez system receptorowy związany z białkami G. Znane są obecnie dwa alternatywne szlaki aktywacji tego enzymu zależne od białek G. Pierwszy szlak związany jest z podjednostką  $\beta/\gamma$  białka G, która stymuluje odmienną od klasycznej formę PI-3kinazy, to jest formę, która nie posiada jednostki regulatorowej p85 i nosi nazwę p110 $\gamma$ . Drugi mechanizm regulacji enzymu przez białka G opiera się na założeniu, że klasyczna forma PI-3kinazy jest aktywowana przez niereceptorową kinazę tyrozynową z grupy Src. Aktywacja kinazy Src zachodzi prawdopodobnie przez związanie podjednostek  $\alpha$  białek G z domeną katalityczną enzymu (Ma i wsp., 2000, Ptasznik i wsp., 1995, Ptasznik i Giewirtz, 2000). Wskazuje to na nowe szlaki przekazywania informacji w komórce z udziałem białek G.

#### **II.4 Wpływ peptydów A $\beta$ na procesy przekazywania informacji na drodze przemian fosfoinozytydów.**

Zaburzenia przekazywania informacji na drodze przemian fosfoinozytydów z udziałem układu cholinergicznego mogą występować na wielu etapach funkcjonowania tego układu. Peptydy A $\beta$  odkładane w postaci płytek starczych w procesie starzenia (Geula i wsp., 1998) oraz w licznych chorobach neurodegeneracyjnych odgrywają istotną rolę w patomechanizmie choroby Alzheimera (Jope, 1996) i są modulatorem kluczowych enzymów układu cholinergicznego (Auld i wsp., 1998). Badania Geula i wsp., 1998 wskazują, że A $\beta$  wyłącznie w mózgach starczych i wyłącznie u kręgowców wyższego rzędu jest odpowiedzialny za zmiany neuropatologiczne charakterystyczne

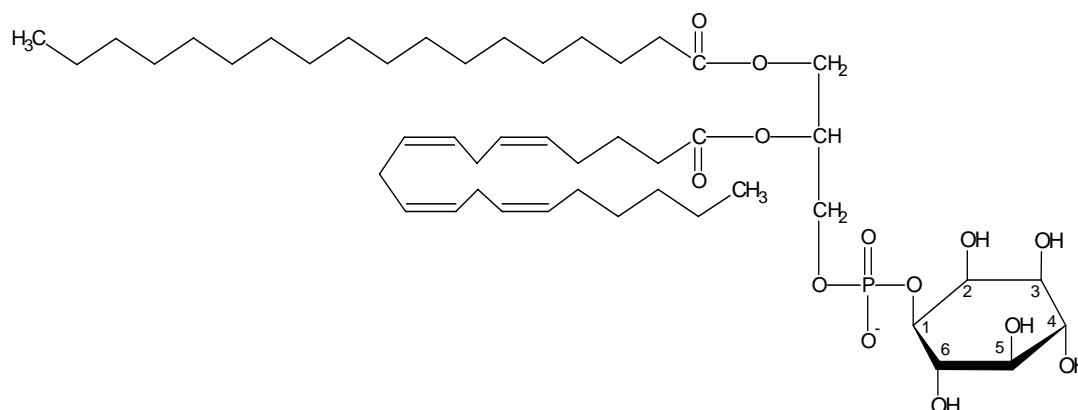
dla choroby Alzheimera. Peptydy A $\beta$  hamują uwalnianie neurotransmitera układu cholinergicznego, acetylocholinę oraz wychwyt i transport cholinę przez komórki hipokampa i kory (Rylett i wsp., 1983, Kar i wsp., 1998) i w wyniku zaburzenia tych procesów dochodzi do zaburzenia syntezy acetylocholinę (Hoshi i wsp., 1997). Badania prowadzone *in vitro* na linii komórkowej PC12 wykazały, że A $\beta$  1-42 nie wpływa na aktywność acetylotransferazy cholinowej (ChAT) odpowiedzialnej za syntezę acetylocholinę (Pedersen i wsp., 1997). W badaniach prowadzonych na komórkach SN56 uzyskanych w wyniku hybrydyzacji komórek neuroblastomy N18TG2 z komórkami z przegrody wykazano, że A $\beta$  1-42 oraz 1-28 obniżają poziom acetylocholinę o około 40% oraz hamują aktywność acetylotransferazy cholinowej (Pedersen i wsp. 1996, Pedersen i Blusztajn, 1997). Należy jednak podkreślić, że badania te były prowadzone na komórkach zmodyfikowanych pod względem genetycznym i biochemicznym, które znacznie różnią się od komórek nerwowych w mózgu. W mózgu alzheimerowskich stwierdzono bardzo wyraźny spadek acetylocholinę w korze mózgu, a przede wszystkim w jądrze Meynerta (Richter i wsp., 1980). Zaobserwowano ubytek liczby połączeń synaptycznych w tym przede wszystkim cholinergicznym oraz obniżenie aktywności markera układu cholinergicznego, acetylotransferazy cholinowej (ChAT) w korze mózgu i hipokampie (Bird i wsp., 1983). Na podstawie tych badań zrodziła się „cholinergiczna” teoria choroby Alzheimera (Bartus i wsp., 1985, Collerton, 1986, Palmer i Gershon, 1990, Perry, 1986). Badania ostatnich lat (Keller i wsp., 1997, Mattson i wsp., 1998) wykazały, że neurotoksyczność peptydów A $\beta$  związana jest z ich lokalizacją wokół zakończeń synaptycznych i że synapsy są miejscem gdzie proces neurodegeneracji się rozpoczyna. Peptydy A $\beta$  uszkadzają w synaptozomach transport glukozy i glutaminianu oraz funkcję mitochondriów (Keller i wsp., 1997). W chorobie Alzheimera (ChA) występują zaburzenia metabolizmu fosfolipidów błon plazmatycznych, wzrost degradacji fosfatydylocholinę i fosfatydyloetanolaminy, z jednocześnie obniżonym poziomem ich prekursorów, cholinę i etanolaminy. W korze mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera jest również obniżony poziom fosfatydyloinozytolu oraz fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (Stokes i Hawthorne, 1987). Uszkodzenie transdukcji sygnału na drodze fosfoinozytydowej badane jest począwszy od roku 1987, kiedy to Stokes i Hawthorne (Stokes i Hawthorne, 1987) wykazali, że w korze mózgu alzheimerowskich występuje obniżony poziom fosfoinozytydów. Rozpoczęły się wówczas intensywne badania

fosfoinozytydowej transdukcji sygnału w chorobie Alzheimera. W 1993 roku zaobserwowano, że w mózgach alzheimerowskich obniżona jest degradacja fosfoinozytydów zależna od receptora muskarynowego (Ferrari-DiLeo i Flynn, 1993). Kolejne badania (Crews i wsp., 1994, Jope 1996, Jope i wsp., 1997) wykazały, że o około 45% obniżona jest degradacja fosfatydyloinozytolu (PI) zależna od białek G i agonisty układu cholinergicznego, natomiast ilość receptorów muskarynowych M1 w mózgach alzheimerowskich nie ulega zmianie (Jope, 1996). Badania Shimohama i wsp., 1998 wykazały, że podstawowa aktywność PI-PLC niezależnie od stężenia wapnia nie ulega zmianie w chorobie Alzheimera. Grupa amerykańskich badaczy (Zhang i wsp., 1998) stwierdziła podwyższony poziom PLC $\gamma$  w błonach synaptoplazmatycznych uzyskanych z hipokampa pacjentów z ChA. Zaobserwowano również wzrost białka izoformy PLC $\delta$  bez zmian jej aktywności u pacjentów z tą chorobą (Shimohama i wsp. 1995, Shimohama i wsp., 1998) i sugerowano udział tej izoformy w fosforylacji białka tau. Badania *in vitro* na komórkach neuroblastomy wykazały, że A $\beta$  25-35 stymuluje aktywność PLC w sposób niezależny od stężenia wapnia i kinazy białkowej C (Singh i wsp., 1995, Singh i wsp., 1997, Hartmann i wsp., 1996). Peptyd ten moduluje również aktywność fosfolipazy C w błonach synaptoplazmatycznych z kory mózgu szczura (Strosznajder i wsp., 1999). Huang i wsp., 2000 stwierdzili, że A $\beta$  25-35 oraz A $\beta$  1-42 obniża zależne od karbacholu uwalnianie IP $_3$  w hodowli neuronów z kory mózgu szczura. W tym samym roku zaobserwowano, że zagregowany A $\beta$  1-40 obniża zależną od Ca $^{2+}$  i od pobudzenia receptora cholinergicznego degradację fosfoinozytydów w korze mózgu (Zambrzycka i wsp., 2000). Ponadto wcześniejsze badania wykazały, że A $\beta$  25-35 oraz A $\beta$  1-28 wywołuje niewielką stymulację PLC w błonach synaptoplazmatycznych, natomiast działanie A $\beta$  1-40 zależy od jego stężenia. A $\beta$  1-40 w 10 $\mu$ M stężeniu stymuluje aktywność tego enzymu, natomiast w wyższym stężeniu wykazuje działanie inhibicyjne (Wallace, 1994). Dotychczasowe wyniki badań są kontrowersyjne i nie w pełni wyjaśnione. Peptydy A $\beta$  poprzez modulację aktywności PLC wywołują zaburzenie homeostazy wapniowej (Hartmann i wsp. 1996). W mózgach pacjentów z chorobą Alzheimera zaobserwowano obniżenie aktywności PI-kinazy we frakcji błonowej, cytozolowej i synaptozomalnej, nie wykazano natomiast różnic w aktywności PIP-kinazy (Jolles i wsp., 1992, Jolles i wsp., 1993). Należy zwrócić uwagę, że w ostatnim dziesięcioleciu dokonał się ogromny postęp w zrozumieniu funkcji

polifosfoinozytydów oraz enzymów biorących udział w ich metabolizmie w regulacji wielu procesów komórkowych. Poszerzyła się wiedza na temat znaczenia fosfolipidów inozytolowych w procesach fizjologicznych jak również w stanach patologicznych. Stwierdzono, że zaburzenia przekaźnictwa informacji w szlaku przemian fosfolipidów inozytolowych mogą odgrywać istotną rolę w patomechanizmie choroby Alzheimera. Ponadto mogą one mieć istotne znaczenie w innych stanach patologicznych (ischemia mózgu, urazy), w których obserwuje się wzrost stężenia peptydów A $\beta$ . Istniejące dane wskazują, że peptydy A $\beta$  modulują przekazywanie informacji na drodze fosfoinozytydowej, jednak mechanizm ich działania pozostaje nadal nie wyjaśniony.

### III ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Peptydy A $\beta$  39/43, produkty degradacji białka prekursorowego amyloidu beta ( $\beta$ APP) obecne są w płynach ustrojowych oraz w płynie zewnątrzkomórkowym w stężeniu pikomolarnym. Stężenie tych peptydów wzrasta w mózgu w procesie starzenia, w różnego typu amyloidozach, po urazach, a przede wszystkim w chorobie Alzheimera. Obecnie uważa się, że peptydy A $\beta$  mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie choroby Alzheimera. Związki te odkładane w postaci blaszek starczych w hipokampie i korze mózgu mogą powodować zaburzenia funkcji licznych układów przekaźnikowych, w tym sprzężonych z przemianami fosfoinozytydów. Fosfolipidy inozytowe, które stanowią 5%-8% wszystkich fosfolipidów błon są bogato reprezentowane w zakończeniach synaptycznych mózgu. Większość z nich (80%) zawiera w pozycji 2 szkieletu glicerolowego kwas arachidonowy (**Rycina 8**).



**Rycina 8.** Schemat cząsteczki fosfatydyloinozytolu.

Fosfoinozytydy znalazły się w ostatnich kilku latach ponownie w centrum zainteresowania badaczy. Ostatnio zwrócono szczególną uwagę na znaczenie przemian fosfolipidów inozytowych i powstających z nich przekaźników informacji w metabolizmie  $\beta$ APP. Badania wskazują na bezpośrednią zależność pomiędzy regulowaną przez diacyloglicerol (DAG) kinazą białkową C (PKC), a uwalnianiem A $\beta$  z  $\beta$ APP. Ponadto najnowsze dane wskazują na coraz szersze fizjologiczne znaczenie fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP<sub>2</sub>) i jego metabolitów w regulacji procesów

synaptycznych, w tym w egzo- i endocytozie pęcherzyków synaptycznych, w funkcji kanałów jonowych oraz w uwalnianiu neurotransmiterów. Kinazy fosfolipidów inozytolowych PI-4kinaza i PIP-5kinaza poprzez interakcję z białkami pęcherzyków synaptycznych wpływają na uwalnianie neurotransmiterów oraz modulują funkcje metabotropowych i jonotropowych receptorów postsynaptycznych. Coraz szersze zainteresowanie wzbudza ich udział w procesach jądrowych. Wiadomo od dawna, że transmisja cholinergiczna oraz prawidłowy metabolizm fosfolipidów inozytolowych w mózgu pełni istotną rolę w procesach uwagi i pamięci, funkcjach poznawczych i uczeniu się. W wyniku pobudzenia receptorów muskarynowych dochodzi do degradacji PIP<sub>2</sub> przez fosfolipazę C (PLC) i uwolnienia 1,4,5-inozytolotrisfosforanu (IP<sub>3</sub>) oraz DAG. IP<sub>3</sub> uwalnia Ca<sup>2+</sup> z siateczki śródplazmatycznej, a DAG aktywuje kinazę białkową C. Czas, w którym IP<sub>3</sub> wywołuje mobilizację Ca<sup>2+</sup> i aktywację kolejnych procesów jest rzędu sekund, przekaźnik ten szybko ulega fosforylacji do IP<sub>4</sub> lub defosforylacji do związków nieaktywnych. Wzrost wapnia w komórce aktywuje z kolei PLC, która hydrolizuje fosfatydyloinozytol (PI). W wyniku degradacji tego lipidu uwalnia się DAG przez co zwiększa się jego pula w komórce w celu podtrzymania sygnału. Zaburzenia układu cholinergicznego i metabolizmu fosfoinozytydów występują w procesie starzenia oraz w chorobach neurodegeneracyjnych m.in. w chorobie Alzheimera. Stwierdzono uszkodzenie funkcji tego układu przekaźnikowego na poziomie receptora, na etapie metabolizmu acetylocholin, syntezy fosfolipidów i ich transportu do błon oraz na poziomie uwalniania wtórnych przekaźników informacji. Celem wielu prac w ostatnim dziesięcioleciu było zrozumienie mechanizmu działania Aβ na układ cholinergiczny. Mimo intensywnych badań w tym zakresie wiele zagadnień pozostaje nadal nie wyjaśnionych. Dotychczasowe prace wykazały, że peptydy Aβ obniżają poziom acetylocholin w neuronach oraz hamują jej uwalnianie, nie wyjaśniono jednak czy powodują one obniżenie aktywności acetylotransferazy cholinowej, kluczowego enzymu w syntezie acetylocholin. Do chwili obecnej nie wyjaśniony pozostaje udział peptydów Aβ w zaburzeniach aktywności fosfolipazy C degradującej PI i PIP<sub>2</sub> w procesie niezależnym i zależnym od pobudzenia receptora cholinergicznego. Wytlumaczenia wymaga mechanizm zaburzeń przekaźnictwa zależny od receptora cholinergicznego i metabolicznych przekaźników drugiego rzędu powstających w wyniku degradacji PIP<sub>2</sub>. Nieliczne prace dotyczące wpływu Aβ na kinazy fosfolipidów inozytolowych odpowiedzialnych za syntezę substratów dla

fosfolipazy C wymagają dalszych badań. Brak jest danych odnośnie udziału A $\beta$  w modulacji białek transportujących fosfatydyloinozitol. Pozostaje nie wyjaśniona rola apolipoproteiny E4 (apoE4) i innych związków towarzyszących peptydom A $\beta$  w modulacji procesów przekazywania informacji na drodze przemian fosfoinozytydów w mózgu. Dalszych badań wymaga znaczenie zmian komponenty lipidowej błony wywołanych procesem starzenia w toksyczności A $\beta$ . Powyższe dane uzasadniały podjęcie zagadnień badawczych dotyczących wymienionych problemów z uwzględnieniem procesu starzenia się mózgu.

### **Celem prezentowanej pracy było:**

**Zbadanie udziału peptydów A $\beta$  w modulacji molekularnych procesów przekazywania informacji na drodze przemian fosfoinozytydów w mózgu.**

Na ten cel złożyły się następujące cele szczegółowe:

1. Zbadanie udziału peptydów A $\beta$  i związków im towarzyszących w zmianach aktywności ChAT, enzymu odpowiedzialnego za syntezę acetylocholin, agonisty receptora cholinergicznego w mózгах dojrzałych i starczych.
2. Określenie udziału peptydów A $\beta$  w zaburzeniu podstawowej oraz zależnej od pobudzenia receptora cholinergicznego i białek G aktywności PIP<sub>2</sub>-PLC
3. Zbadanie wpływu peptydów A $\beta$  na konstytutywną i zależną od pobudzenia receptora muskarynowego i IP<sub>3</sub> aktywność polimerazy (poli-ADP)rybozy w mózgu dojrzałym i starczym.
4. Zbadanie wpływu peptydów A $\beta$  oraz apoE4 na fosfolipazę C degradującą fosfatydyloinozitol (PI-PLC).
5. Ocena udziału peptydów A $\beta$  w procesach fosforylacji fosfolipidów inozytolowych oraz w regulacji aktywności kinaz tych fosfolipidów w mózгах dojrzałych i starczych.
6. Zbadanie wpływu peptydów A $\beta$  na zależną od lipidowych mediatorów aktywację cytozolowego czynnika(-ów) w synaptozomach odpowiedzialnego za degradację jądrowego DNA.



## **IV MATERIAŁY I METODY.**

### **IV.1 Zwierzęta doświadczalne.**

Do doświadczeń używano szczurów dorosłych i starych, rasy Wistar, z hodowli prowadzonej w IMDiK PAN, w Warszawie. Osobniki płci męskiej w wieku 4 miesięcy i masie ciała 300g były traktowane jako zwierzęta dorosłe, natomiast osobniki płci męskiej w wieku 24 miesięcy i masie ciała 500g były traktowane jako zwierzęta stare. Zwierzęta hodowano w warunkach stabilnej temperatury, wilgotności i diety.

### **IV.2 Przygotowanie peptydów A $\beta$ i ocena struktury drugorzędowej.**

#### **IV.2.1 Przygotowanie peptydów A $\beta$ .**

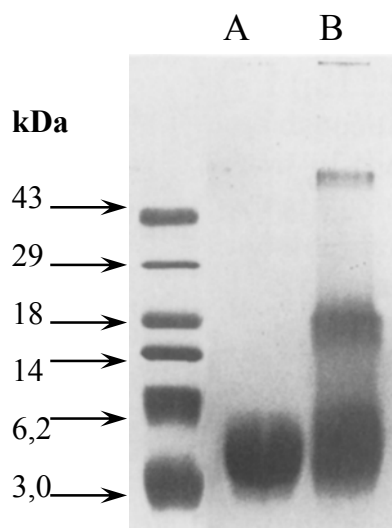
A $\beta$  1-42 i 1-40 rozpuszczano w wodzie dejonizowanej i bidestylowanej w stężeniu 250 $\mu$ M natomiast A $\beta$  25-35, 1-28 i 35-25 w stężeniu 2,5mM i używano bezpośrednio do doświadczeń lub poddawano „starzeniu”. A $\beta$  1-42 inkubowano przez 1 godzinę w łaźni wodnej o temperaturze 37°C, A $\beta$  1-40 inkubowano przez 14 dni, natomiast A $\beta$  25-35 przez 7 dni w temperaturze pokojowej.

#### **IV.2.2 Ocena struktury drugorzędowej peptydów A $\beta$ przy pomocy metody dichroizmu kołowego.**

Strukturę A $\beta$  1-40 i 25-35 poddanych starzeniu oznaczono metodą dichroizmu kołowego. Pomiaru spektropolarymetrycznego dokonywano przy użyciu spektropolarymetru CD 62 DS w temp. 20°C. Badane próbki umieszczano w kuetce o długości ścieżki optycznej 0,5 cm i dla każdej próbki dokonywano trzech odczytów, odczyty następnie uśredniano. Wyniki wyrażano w formie molarnej eliptyczności ( $\theta$ ). Peptydy A $\beta$  1-40 posiadały dominującą strukturę drugorzędową typu  $\beta$ , podczas gdy A $\beta$  25-35 wykazywał widmo absorpcyjne typowe dla struktury typu „*random coil*” (postać kłęбка statystycznego).

#### IV.2.3 Ocena agregacji peptydów A $\beta$ na podstawie elektroforezy na żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących.

Rozdział elektroforetyczny peptydów A $\beta$  1-40 w warunkach denaturujących prowadzono według metody Schäggera i von Jagowa, 1987, używając aparatu do elektroforezy firmy BIO-RAD. A $\beta$  1-40 nie agregowany lub poddany agregacji mieszano z taką samą objętością buforu do próbek (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20% glicerol, 2% SDS, 100 mM DTT oraz 0,2 mM błękit bromofenolu) i umieszczano na 5 min w bloku grzejnym w temperaturze 95°C. Po schłodzeniu, niewielką ilość próby zawierającą 5 $\mu$ g peptydu наносono do studzienek elektroforetycznych w żelu poliakrylamidowym i przeprowadzono elektroforezę. Używano żeli poliakrylamidowych o grubości 1mm. Do rozdziału peptydów używano akrylamidu zawierającego 3% bis-akrylamid jako czynnik sieciujący. Żel rozdzielający zawierał 15% akrylamidu, 1M Tris-HCl, pH 8,43 oraz 0,1% SDS. Żel zagęszczający składał się z 4% akrylamidu, 0,1% SDS oraz 0,74M Tris-HCl, pH 8,43. Inicjację reakcji polimeryzacji uzyskiwano dodając nadsiarczan amonowy i TEMED (odpowiednio 33,3mg i 33 $\mu$ l w przeliczeniu na 100ml roztworu). Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 30V przez jedną godzinę, a następnie przy napięciu 90V przez 2 godziny. Po elektroforezie żele barwiono przy pomocy błękitu Coomassie'ego (Rycina 9).



**Rycina 9. Elektroforeza peptydów A $\beta$  1-40 na żelu poliakrylamidowym-SDS.**

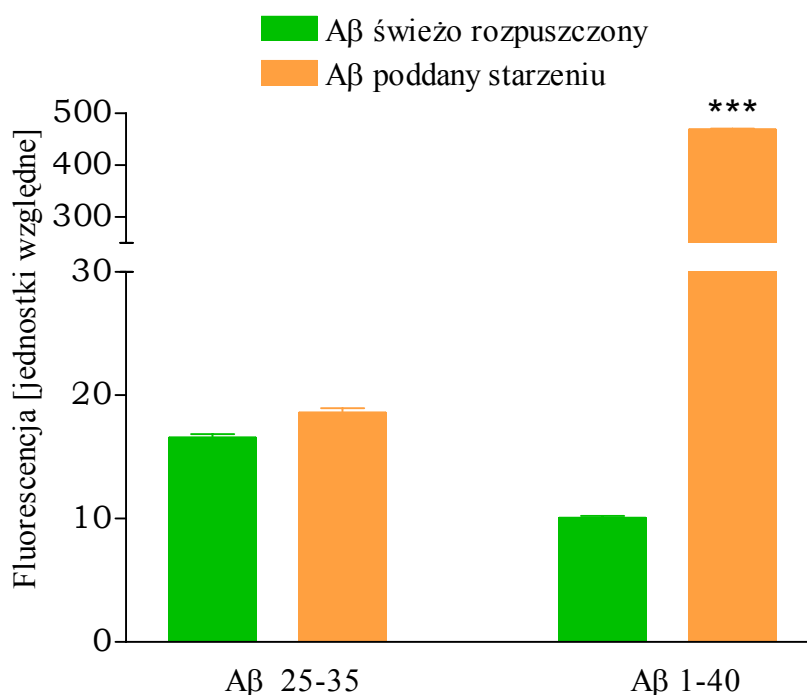
*A $\beta$  1-40 rozpuszczano w wodzie dejonizowanej i bidestylowanej w stężeniu 250 $\mu$ M i poddawano "starzeniu" przez 14 dni w temperaturze pokojowej. Do elektroforezy*

*używano A $\beta$  bezpośrednio po rozpuszczeniu lub poddany 14-dniowej inkubacji. A - A $\beta$  1-40 świeżo rozpuszczony; B - A $\beta$  1-40 inkubowany 14 dni;*

Analiza elektroforetyczna wykazała, że wyłącznie A $\beta$  1-40 poddany starzeniu tworzy agregaty o masie molekularnej około 18 kDa. A $\beta$  1-40 nie poddany starzeniu nie wykazuje tendencji do tworzenia agregatów. W związku z tym w dalszej pracy w stosunku do A $\beta$  1-40 poddanego starzeniu używa się określenia „zagregowany”, natomiast A $\beta$  nie poddany agregacji określa się jako „rozpuszczalny” bądź „niezagregowany”.

#### **IV.2.4 Ocena fibrylizacji (agregacji) peptydów A $\beta$ przy użyciu tioflawiny-T.**

Spektrofluorymetrię z użyciem tioflawiny-T (Th-T) zastosowano do ilościowej oceny tworzenia włókien przez peptydy A $\beta$  zawierających strukturę  $\beta$ -kardki. Peptydy A $\beta$  1-40 inkubowano w stężeniu 250 $\mu$ M, natomiast A $\beta$  25-35 w stężeniu 2,5mM w H<sub>2</sub>O dejonizowanej bidestylowanej. Po inkubacji 10 $\mu$ l A $\beta$  1-40 oraz 1 $\mu$ l A $\beta$  25-35 dodawano do 3 $\mu$ M Th-T w końcowej objętości 300 $\mu$ l 50mM buforu fosforanowego, pH 6,0. Pomiar fluorescencji Th-T wykonywano używając spektrofluorymetru LS 50 B (Perkin Elmer) przy długości fali światła pobudzającego 450nm i długości fali światła emitowanego 482nm, w 300 $\mu$ l 50mM buforu fosforanowego, pH 6,0. Fluorescencję Th-T badano przez 300 sek., a średnia wyników po 280 sek., 290 sek. i 300 sek. stanowiła końcowy wynik dla danej próbki. Każdą inkubację wykonywano w trzech powtórzeniach. (**Rycina 10**).



#### Rycina 10. Tworzenie włókien przez peptydy Aβ

Peptydy Aβ 1-40 inkubowano w stężeniu 250 μM, natomiast Aβ 25-35 w stężeniu 2,5 mM w H<sub>2</sub>O dejonizowanej bidestylowanej. Po inkubacji peptydów oznaczano ich fluorescencję przy użyciu Th-T. Od wartości fluorescencji próby badanej odejmowano wartość fluorescencji samej Th-T. W obecności włókien amyloidowych Th-T wykazuje fluorescencję proporcjonalną do ilości włókien. W obecności Aβ 1-40 poddanego starzeniu Th-T wykazuje fluorescencję 468 ± 2,36 (średnia z trzech doświadczeń ± SD). W obecności Aβ 25-35 niezależnie od jego inkubacji oraz z Aβ 1-40 nie poddanym inkubacji Th-T wykazuje niewielką fluorescencję. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych pomiarów w trzech powtórzeniach (średnia ± SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keuls, \*\*\*p < 0,001 w stosunku do fluorescencji Aβ 1-40 rozpuszczalnego.

### IV.3 Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz.

Zwierzęta dekapitowano, izolowano mózg, a następnie na schłodzonej do temperatury 4°C szalce Petriego preparowano półkule mózgowie w celu usunięcia opon, naczyń oraz istoty białej. Następnie izolowano korę mózgu, hipokamp i prążkowie.

### **IV.3.1 Preparatyka skrawków.**

Z wyizolowanych części mózgu otrzymywano skrawki o grubości 0,35 x 0,35 mm na schłodzonym stoliku do temperatury 4°C przy użyciu aparatu Mc Illwaina. Następnie skrawki zawieszano w buforze Krebs-Henseleit (KRBS) o składzie: 120mM NaCl; 5mM KCl; 1,2mM MgSO<sub>4</sub>; 1,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25mM NaHCO<sub>3</sub> i 10mM glukoza, równoważonym karbogenem (mieszanina 95%O<sub>2</sub> i 5%CO<sub>2</sub>) do uzyskania pH 7,4. Skrawki równoważono w środowisku karbogenu przez 60 minut w łaźni wodnej z wytrząsaniem o temperaturze 37°C w celu przywrócenia równowagi metabolicznej. Skrawki z różnych części mózgu dojrzałego i starczego używano do badania udziału peptydów A $\beta$  w modulacji aktywności wybranych enzymów oraz do oznaczania poziomu białka fosfolipazy C.

### **IV.3.2 Preparatyka frakcji synaptoneurozomalnej.**

Frakcję synaptoneurozomalną otrzymywano według procedury opisanej przez Hollingsworth i wsp., 1985 i zmodyfikowanej przez Strosznajder i Samochocki, 1991. Z wyizolowanej kory mózgowej otrzymywano skrawki o grubości 0,35 x 0,35 mm na schłodzonym stoliku do temperatury 4°C przy użyciu aparatu Mc Illwaina. Następnie umieszczano je w homogenizatorze Dounce'a i homogenizowano ręcznie (pięć przesuwów tłoka, typ A) w temperaturze 4°C w 7 ml buforu Krebs-Henseleit (KRBS) o składzie: 120mM NaCl; 5mM KCl; 1,2mM MgSO<sub>4</sub>; 1,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25mM NaHCO<sub>3</sub> i 10mM glukoza, równoważonym karbogenem (mieszanina 95%O<sub>2</sub> i 5%CO<sub>2</sub>) do uzyskania pH 7,4. Otrzymaną zawiesinę rozcieńczano do objętości 35ml buforem KRBS i wirowano przy 1100 x g przez 15 minut w celu osadzenia frakcji synaptoneurozomalnej. Nadsącz odrzucano a osad zawieszano w 5ml świeżego buforu KRBS i oznaczano białko.

### **IV.3.3 Preparatyka frakcji synaptozomalnej i cytozolu synaptozomalnego.**

Frakcję synaptozomów otrzymywano zgodnie z metodą opisaną przez Mattsona (Mattson i wsp., 1998). Synaptozomy otrzymywano z kory mózgu szczurów

dojrzałych. Korę mózgu homogenizowano w szklanym homogenizatorze Dounce'a (12 przesuwów tłoka, typ A) w temperaturze 4°C w 8 ml buforu zawierającego: 0,32 M sacharozę, 4µg/ml pepstatyny, 5µg/ml aprotyniny 20 µg/ml inhibitora trypsyny, 4µg/ml leupeptyny, 0,2mM PMSF, 2mM EDTA, 2mM EGTA i 20mM HEPES. Otrzymany 10% homogenat wirowano 3 min. przy 900 x g w 4°C. Osad odrzucano, a otrzymany nadsącz wirowano 10 min 12400 x g w 4°C. Otrzymany osad zawieszano w 1,5 ml buforu, który był używany do homogenizacji i nakładano na gradient sacharozowy (3,5 ml 1,18 M sacharoza, pH 8,5, 3,5 ml 1 M sacharoza, pH 8,0, 3,5 ml 0,85 M sacharoza, pH 8,0). Następnie wirowano 2 h przy 87275 x g w 4°C. Po odwirowaniu delikatnie zbierano warstwę synaptozomów na granicy warstw 1M sacharoza/1,18M sacharoza, zawieszano w 4 objętościach buforu Locke'a (154mM NaCl; 5,6mM KCl; 2,3mM CaCl<sub>2</sub>; 1mM MgCl<sub>2</sub>; 3,6mM NaHCO<sub>3</sub>; 5mM HEPES; 5mM glukoza; pH 7,2) i wirowano 10 min przy 17000 x g w 4°C. Otrzymany osad zawierający synaptozomy zawieszono w 0,5 ml buforu Locke'a. Synaptozomy używano bezpośrednio do dalszych badań. W celu uzyskania cytozolu synaptozomalnego synaptozomy wirowano w probówkach eppendorf 5 min. przy 10000 x g w 4°C. Nadsącz odrzucano, a osadzone na dnie probówki synaptozomy zawieszano w 100µl buforu HEPES w stężeniu 1mM, pH 7,4 i rozbijano strzykawką. Homogenat synaptozomów pozostawiono na 30 min. w lodzie i czynność powtarzano. Następnie rozbite synaptozomy wirowano 30 min. przy 10000 x g w 4°C. Nadsącz zawierający cytozol z synaptozomów używano do inkubacji z frakcją jądrową.

#### **IV.3.4 Przygotowanie homogenatu.**

Wyizolowaną korę mózgową, hipokamp lub prądkowie dorosłych lub starych szczurów homogenizowano ręcznie w temperaturze 4°C w szklanym homogenizatorze Dounce'a (czternaście przesuwów tłoka, typ A) w medium izolacyjnym zawierającym 0,32M sacharozę rozpuszczona w 10mM buforze Tris-HCl, pH 7,4. Otrzymany 10% homogenat używano do doświadczeń lub wirowano w celu uzyskania frakcji podkomórkowych: błon synaptoplazmatycznych (SPM) i cytozolu.

### **IV.3.5 Otrzymywanie błon synaptoplazmatycznych i cytozolu z kory mózgu.**

W celu uzyskania SPM i cytozolu komórkowego, homogenat z kory mózgu dojrzałego lub starczego wirowano 3 minuty przy 900 x g w temperaturze 4°C. Osad ( $P_1$ ) odrzucano, a nadsącz ( $S_1$ ) wirowano ponownie 10 minut przy 17 000 x g. Z nadsączu ( $S_2$ ) uzyskiwano frakcję cytozolu komórkowego, natomiast osad ( $P_2$ ), stanowiący frakcję synaptozomalno-mitochondrialną poddawano szokowi hipoosmotycznemu oraz ręcznej homogenizacji w homogenizatorze Dounce'a (dziesięć przesuwów tłoka, typ A) w 1mM buforze Tris-HCl, pH 7,4 o temperaturze 4°C i umieszczano zawiesinę w łaźni lodowej na 30 minut. Zawiesinę następnie wirowano 10 minut przy 9 000 x g, zbierano nadsącz do probówki, a osad powtórnie homogenizowano i wirowano. Połączone nadsącze ostatecznie wirowano 20 minut przy 48 000 x g, osadzając frakcję SPM. Otrzymaną frakcję SPM zawieszano w 10mM buforze Tris-HCl, pH 7,4.

Frakcję cytozolu komórkowego otrzymywano, wirując postmitochondrialny nadsącz  $S_2$  100 000 x g przez 60 minut.

### **IV.3.6 Preparatyka frakcji jąder komórkowych.**

Frakcję jąder komórkowych otrzymywano zgodnie z metodą opisaną przez Mattsona (Mattson i wsp., 1993a). Jądra komórkowe otrzymywano z kory mózgu szczurów dorosłych. Korę mózgu homogenizowano w buforze A zawierającym 10mM HEPES, pH 7,5, 5mM  $MgCl_2$ , 10mM KCl i 1mM DTT, a następnie wirowano 3 min przy 900 x g w 4°C. Otrzymany osad zawieszano w 2 ml buforu A i nakładano na warstwę 30% sacharozy w buforze A (10ml). Następnie wirowano 10 min przy 840 x g w 4°C. Po odwirowaniu zbierano osadzoną na dnie probówki frakcję jądrową i zawieszano w 0,4 ml buforu A. Otrzymaną frakcję jądrową używano bezpośrednio do inkubacji z cytozolem otrzymywanym z synaptozomów.

## IV.4 Metody biochemiczne oznaczania aktywności enzymów.

### IV.4.1 Oznaczanie aktywności acetylotransferazy cholinowej (ChAT).

Aktywność ChAT oznaczono zgodnie z metodą opisaną przez Fonnum, 1975 przy użyciu egzogennych substratów: choliny i [ $^{14}\text{C}$ ]acetylo-CoA. Źródłem enzymu był homogenat, SPM i cytozol. Wpływ różnych form peptydów A $\beta$  na aktywność ChAT badano po uprzedniej inkubacji skrawków z kory mózgu, prążkowiec i hipokampa zwierząt dorosłych, dorosłych-starych i starych. Skrawki stabilizowano w łaźni wodnej przez jedną godzinę w temperaturze 37°C w środowisku karbogenicznym. Następnie do zawiesiny skrawków podano peptydy A $\beta$  w stężeniu od 25 do 100  $\mu\text{M}$  i inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez jedną godzinę. Kolejno skrawki odwirowano przy 900 x g przez 10 min. i zawieszono w 50mM buforze fosforanowym, pH 7,4 i przygotowano 10% homogenat. Do oznaczeń pobierano po 10  $\mu\text{l}$  10% homogenatu i dodawano do 10  $\mu\text{l}$  mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 10mM bromek choliny, 0,5mM [ $^{14}\text{C}$ ]acetylo-CoA (aktywność specyficzna 55,3mCi/mmol, 0,04  $\mu\text{Ci}$  na próbkę), 0,1mM eserynę 300mM NaCl, oraz 50 mM bufor fosforanowy, pH 7,4. Następnie próby inkubowano w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 15 min. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 2,5 ml 10mM buforu fosforanowego pH 7,4. Kolejno do prób dodawano 1 ml butyronitrylu zawierającego 15 mg  $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{BNa}$  i wortexowano przez 2 minuty. Następnie próby wirowano 10 minut przy 3 000 x g w celu rozdzielenia faz. 0,5 ml górnej fazy organicznej zawierającej powstałą [ $^{14}\text{C}$ ]acetylocholinę odbierano do naczynek scyntylicyjnych zawierających 5ml toluenu i 2 ml acetonitrylu. Radioaktywność [ $^{14}\text{C}$ ]acetylocholinę mierzono w liczniku scyntylicyjnym LKB Wallac 1409 stosując czas zliczania 5 minut.

### IV.4.2 Oznaczanie aktywności fosfolipazy C.

Aktywność PI-PLC oraz PIP $_2$ -PLC w błonach synaptoplazmatycznych i cytozolu oznaczono przez pomiar poziomu radioaktywności rozpuszczalnych w wodzie metabolitów inozytolu powstających ze znakowanych substratów według metody opisanej przez Rhee i wsp., 1991. Do badań używano egzogennych substratów: fosfatydylo[ $^3\text{H}$ ]inozytofosforanu (PI) i fosfatydylo[2- $^3\text{H}$ ]inozytolo-4,5-bisfosforanu



(PIP<sub>2</sub>). Substraty do reakcji, 20nmoli (4 x 10<sup>4</sup> dpm) PI lub 10nmoli (2 x 10<sup>4</sup> dpm) PIP<sub>2</sub>, z których odparowano organiczny solwent zawieszano w 0,1% dezoksyholanie sodu (DOC) i w przypadku PI w 20mM buforze Tris-HCl, pH 7,8 i w buforze Tris-HCl pH 6,6 w przypadku PIP<sub>2</sub>. Mieszanina reakcyjna zawierała ponadto: 10mM LiCl, 0-2mM CaCl<sub>2</sub> lub 10mM EGTA oraz 100μg białka. Objętość końcowa mieszaniny reakcyjnej wynosiła 200μl. Wpływ peptydów Aβ na aktywność fosfolipazy C określano po inkubacji mieszaniny reakcyjnej w obecności Aβ 25-35, 1-40 oraz 35-25 w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 30 minut w przypadku PI-PLC lub 15 minut w przypadku PIP<sub>2</sub>-PLC. Reakcję degradacji fosfolipidów przerywano 1 ml mieszaniny chloroform/metanol/HCl (100/100/0,6, v/v/v). Następnie do prób dodawano 0,3ml H<sub>2</sub>O i wirowano 5 minut x 1500g w celu rozdzielenia faz. 0,5ml z 1ml górnej fazy wodnej odbierano i oznaczano poziom radioaktywności inozytlofosforanów w liczniku scyntylicyjnym LKB Wallac 1409 stosując czas zliczania 5 minut. W każdym doświadczeniu wykonywano próbę ślepą inkubowaną w czasie 30 lub 15 minut w temperaturze 37°C bez dodawania źródła enzymu. W celu wykluczenia udziału innych fosfolipaz PLA<sub>2</sub> i PLD przeprowadzano analizę rozpuszczalnych w wodzie metabolitów inozytoli przy użyciu chromatografii kolumnowej

#### **IV.4.2.1 Rozdział rozpuszczalnych w wodzie metabolitów inozytoli przy zastosowaniu chromatografii kolumnowej.**

0,5ml górnej fazy wodnej zawierającej wodno-rozpuszczalne metabolity inozytoli nakładano na kolumny o długości 7 cm i średnicy 0,5 cm, których wypełnienie stanowił Dowex AG-1 x 8 (200-400 mesh). Z kolumny wmywano kolejno metabolity inozytoli. Pierwszą frakcję inozytoli wmywano 15ml wody bidestylowanej, następnie frakcję glicerofosfoinozytoli (GPI) eluowano 15 ml roztworu tetraboranu sodowego w mrówczanie sodu (5mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>/60mM HCOONa). Eluat zbierano po 5ml do trzech kolejnych probówek. Inozytlofosforany: IP<sub>1</sub>, IP<sub>2</sub> i IP<sub>3</sub> wmywano używając wzrastających stężeń buforu mrówczanowego odpowiednio 0,2M HCOONH<sub>4</sub>/0,1M HCOOH, 0,4M HCOONH<sub>4</sub>/0,1M HCOOH, 1,0M HCOONH<sub>4</sub>/0,1M HCOOH. IP<sub>1</sub> i IP<sub>2</sub> zbierano w trzech porcjach po 4, 2 i 2 ml, natomiast IP<sub>3</sub> zbierano w dwu porcjach po 2ml. Z każdej porcji eluatu odbierano 0,5 ml w celu policzenia całkowitej radioaktywności rozdzielonych metabolitów.

#### IV.4.3 Oznaczanie aktywności polimerazy(poli-ADP)rybozy (PARP).

Wpływ pobudzenia receptora muskarynowego układu cholinergicznego oraz udział peptydów A $\beta$  w modulacji aktywności PARP badano na skrawkach z kory mózgu i hipokampa zwierząt dorosłych i starych. Skrawki zawieszano w buforze Krebs-Henseleit bez wapnia i stabilizowano przez 30 minut w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Następnie skrawki inkubowano w tym samym buforze lecz w obecności 2mM CaCl<sub>2</sub> oraz 1mM karbacholu i 100 $\mu$ M GTP( $\gamma$ )S lub w obecności 1-25 $\mu$ M A $\beta$  25-35 lub 25 $\mu$ M A $\beta$  1-40. Po inkubacji skrawki homogenizowano i oznaczano aktywność PARP przy użyciu radioaktywnego substratu [<sup>14</sup>C]dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD). Mieszanina reakcyjna w końcowej objętości 100 $\mu$ l zawierała 200  $\mu$ M ( $4 \times 10^5$  dpm) NAD (specyficzna aktywność: 252mCi/mmol), 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT oraz 200  $\mu$ g białka. Reakcję przeprowadzano przez 1 minutę w temperaturze 37°C. Reakcję zatrzymywano 0,8ml 25% zimnego kwasu trójchlorooctowego (TCA). Następnie próby przesączało pod ciśnieniem stosując filtry Whatman GF/B i pięciokrotnie przepłukiwano 3ml 5% TCA. Radioaktywność włączonej poli(ADP-rybozy) w białkach zatrzymanych na filtrach oznaczano w scyntylicytorze Bray'a w liczniku scyntylicyjnym LKB Wallac 1409 stosując czas zliczania 5 minut.

#### IV.4.4 Oznaczanie aktywności kinaz fosfolipidów inozytowych: PI-4kinazy i PIP-5kinazy.

Aktywność PI-4kinazy i PIP-5kinazy oznaczano we frakcji błon synaptoplazmatycznych z kory mózgu i hipokampa zwierząt dorosłych i starych. Badania prowadzono w obecności endogennych fosfolipidów oraz przy użyciu egzogennych fosfolipidów: PI lub PIP (5 nmoli). Do reakcji używano 30 $\mu$ g białka, które zawieszono w mieszaninie inkubacyjnej zawierającej: 50mM bufor Tris-HCl, pH 7,4, 0,1mM ATP, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2% detergent Igepal, 1mM EGTA, 1mM DTT, 50 $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> i 0,5 $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP w końcowej objętości 50 $\mu$ l. Próby inkubowano 5 minut w temperaturze 30°C. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 400 $\mu$ l zimnego 25mM ATP oraz 1ml mieszaniny chloroform/metanol w stosunku objętościowym 2:1. Próby mieszano przez 2 minuty, a następnie wirowano 10 min 900 x g. Odbierano dolną fazę

chloroformową, a pozostałą górną fazę płukano 1ml mieszaniny chloroform/metanol/HCl stężony w stosunku objętościowym 100:100:0,6 i ponownie odbierano dolną fazę. Połączono obie dolne fazy i płukano trzykrotnie mieszaniną chloroform/metanol/0,6M HCl (3:48:47 v/v/v). Dolną fazę organiczną zawierającą fosfolipidy odparowywano do sucha pod azotem, zawieszano w niewielkiej ilości chloroformu i nakładano na płytkę chromatograficzną, którą rozwijano w układzie chloroform/metanol/4N NH<sub>4</sub>OH (9:7:2 v/v/v). Płytkę wywoływano w jodzie, plamy identyfikowano zgodnie ze standardem, zeszkrobywano i przenoszono do naczynek scyntylicyjnych zawierających scyntylator toluenowy. Radioaktywność badanych prób oznaczano w liczniku scyntylicyjnym LKB Wallac 1409 stosując czas zliczania 5 minut.

#### **IV.5 Oznaczenie uwalniania kwasu arachidonowego (KA) i diacyloglicerolu (DAG) z błon synaptoplazmatycznych.**

##### **IV.5.1 Oznaczenie uwalniania [<sup>14</sup>C]KA z egzogenego 1-stearylo-2-[<sup>14</sup>C]arachidonylo-fosfatydyloinozytolu przez enzymy błonowe kory mózgu.**

Do probówki inkubacyjnej dodawano 20 nmoli 1-stearylo-2-arachidonylo-PI, rozpuszczonego w chloroformie, oraz taką ilość jego znakowanej formy (1-stearylo-2-[1-<sup>14</sup>C]arachidonylo-PI ([<sup>14</sup>C]PI), aby uzyskać aktywność specyficzną substratu równą 1000dpm/nmol. Roztwór dokładnie mieszano i odparowywano rozpuszczalnik w strumieniu azotu. Następnie dodawano 20mM bufor Tris-HCl, pH 7,4 oraz określoną objętość roztworu dezoksyholanu sodu tak, aby jego stężenie końcowe wynosiło 0,1%. Reakcję rozpoczynano dodając 200µg białka frakcji SPM izolowanej z kory mózgu. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 200µl. Próby inkubowano w łaźni wodnej z mieszaniem o temperaturze 37°C przez 20 minut, po czym reakcję przerywano dodając 3ml mieszaniny chloroform/metanol (1:2, v/v) i ekstrahowano lipidy.

### **IV.5.2 Ekstrakcja lipidów.**

Lipidy ekstrahowano 2,5ml mieszaniny chloroform/metanol (1:2 v/v) zgodnie z warunkami opisanymi przez Bligh'a i Dyer'a, 1959. Ekstrakt pozostawiano na 5 min. w temp. 4°C, a następnie dodawano odpowiednie objętości chloroformu oraz wody destylowanej. Całość wytrząsano energicznie 30 sekund i pozostawiano na 5 min. w temp. 4°C. W celu dokładnego rozdzielania faz, próby wirowano przy 3500 obrotów przez 10 minut. Fazę dolną, zawierającą lipidy odparowywano w strumieniu azotu.

### **IV.5.3 Rozdzielanie lipidów.**

Dolną fazę chloroformową po ekstrakcji lipidów suszono pod azotem i rozpuszczano w 80µl mieszaniny chloroform: metanol (9/1 v/v) i nakładano no płytke chromatograficzną (TLC). Po nałożeniu płytke dokładnie suszono. Wolne kwasy tłuszczowe i diacyloglicerol rozdzielano na płytce umieszczonej w komorze zawierającej mieszaninę chloroform/acetone (96/4 v/v) lub chloroform/metanol/4MNH<sub>4</sub>OH (9/7/2 v/v/v). Po rozwinięciu i odparowaniu rozpuszczalników płytke wywoływano w jodzie, miejsca lokalizacji wolnych kwasów tłuszczowych i diacyloglicerolu identyfikowano przy użyciu wzorców. Plamy zeszkrobywano z płytki, całość przenoszono do naczynek scyntylacyjnych i oznaczano radioaktywność.

## **IV.6 Immunodetekcja izoform PLC, białek transportujących fosfatydyloinozitol oraz PARP metodą Western blotu.**

### **IV.6.1 Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE).**

Zawiesinę skrawków mieszano z taką samą objętością buforu zawierającego 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20% glicerol, 2% SDS, 100 mM DTT oraz 0,2 mM błękit bromofenolu i umieszczano na 5 min w bloku grzeijnym w temperaturze 95°C. Po schłodzeniu, niewielką ilość próby zawierającą 7-10µg białka nanoszono do studzienek elektroforetycznych w żelu poliakrylamidowym i przeprowadzano elektroforezę. Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących prowadzono według metody Schäggera i von Jagowa (1987), używając aparatu do elektroforezy firmy BIO-

RAD. Rozdział prowadzono na żelach o grubości 0,75 mm, używając 30% akrylamidu zawierającego 2,67% bis-akrylamid jako czynnik sieciujący. Stosowano nieciągły gradient akrylamidu, używając w każdym przypadku 4% żelu zagęszczającego oraz w przypadku PLC żelu rozdzielającego 7,5%, a w przypadku białek transportujących i PARP-u 15%. Żel rozdzielający zawierał odpowiednią ilość akrylamidu w zależności od rozdzielanych białek oraz 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 i 0,1% SDS. Żel zagęszczający w każdym przypadku składał się z 4% akrylamidu, 0,1% SDS i 0,5M Tris-HCl, pH 6,8. Inicjację reakcji polimeryzacji uzyskiwano dodając 10% nadsiarazan amonowy i TEMED (odpowiednio 50 $\mu$ l i 5 $\mu$ l na 10ml roztworu). Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 250V przez 45 minut. Po elektroforezie białka z żelu były przenoszone na błony nitrocelulozowe Hybond-Extra C (Amersham) lub PVDF.

#### **IV.6.2 Przenoszenie białek z żelu na błony nitrocelulozowe lub błony PVDF.**

Rozdzielone białka w przypadku badania fosfolipazy C i białek transportujących przenoszone były z żeli poliakrylamidowych metodą elektroblotu na błony nitrocelulozowe Hybond-Extra C (Amersham), a w przypadku PARP-u na membranę PVDF (BioRad). Elektroblotting prowadzono przez 2 godziny przy stałym natężeniu prądu 1,1 mA /cm<sup>2</sup> w buforze: 25mM Tris-HCl, pH 8,3, 192mM glicyna i 20% (v/v) metanol w przypadku PLC i białek transportujących lub w buforze węglanowym Dunn'a (10mM NaHCO<sub>3</sub>, 3mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 20% v/v metanol) w przypadku PARP-u. Efektywność przenoszenia białek na błony sprawdzano czerwienią Ponceau S. Po zakończeniu transferu błony nitrocelulozowe lub PVDF zawierające białka inkubowano 1 godzinę w temperaturze pokojowej w 100mM buforze fosforanowym zawierającym 100mM NaCl, (PBS) oraz 0,1% Tween-20, 1% BSA i 5% odtłuszczone mleko w celu zablokowania wiązań niespecyficznych.

#### **IV.6.3 Analiza immunochemiczna białek.**

##### **IV.6.3.1 Analiza immunochemiczna izoform PLC: $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ .**

Inkubację z pierwszorzędowym przeciwciałem poliklonalnym przeciwko PLC- $\beta$ , PLC- $\gamma$  i PLC- $\delta$  (Santa Cruz Biotechnology) w rozcieńczeniu 1:500 prowadzono około 12 godzin w temperaturze 4°C w buforze PBS-T zawierającym 3% BSA.

Następnie po trzykrotnym płukaniu w buforze PBS-T (3 x 15 minut) błony inkubowano przez 45 minut z drugorzędowym przeciwciałem typu IgG sprzężonym z peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:8000 w buforze PBS-T zawierającym 5% mleko i 1% BSA. Po ponownym czterokrotnym (3 x 15 min w PBS-T 1 x 15 min w PBS) płukaniu poddano immunodetekcji stosując metodę chemiluminescencji (ECL), wykorzystując firmowy zestaw Amersham. Błony eksponowano w ciemni na kliszę Hiperfilm™-ECL (Amersham). Czas naświetlania klisz Hyprefilm™-ECL (Amersham) wynosił 5-15 min. Zaczernienie analizowano densytometrycznie używając densytometru firmy LKB (Ultrascan XL i programu GelScan).

#### **IV.6.3.2 Analiza immunochemiczna białek transportujących PI-TP $\alpha$ .**

W czasie całej procedury używano 100mM bufor fosforanowy pH 7,5 zawierający 100mM NaCl i 0,05% Tween-20 (PBS-T). Wszystkie inkubacje prowadzono w temperaturze pokojowej. Wiązania niespecyficzne na błonach nitrocelulozowych zawierających rozdzielone białka wysycano 5% roztworem odtłuszczonego mleka w buforze PBS-T przez 1 godzinę. Następnie prowadzono inkubację przez około 12 godzin z pierwszorzędowym przeciwciałem monoklonalnym przeciwko PI-TP $\alpha$  (Affiniti, Wielka Brytania) w rozcieńczeniu 1:200 w buforze PBS-T zawierającym 2,5% roztwór odtłuszczonego mleka. Następnie po trzykrotnym płukaniu w PBS-T (3 x 10 minut) błony inkubowano przez 1 godzinę z drugorzędowym przeciwciałem typu IgG sprzężonym z alkaliczną fosfatazą w rozcieńczeniu 1:1000 w buforze PBS-T. Po ponownym trzykrotnym (3 x 10min) płukaniu poddano immunodetekcji używając buforu do alkalicznej fosfatazy (0,1M NaHCO<sub>3</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, pH 9,8). Grubość prążków analizowano densytometrycznie używając densytometru firmy LKB (Ultrascan XL i programu GelScan).

#### **IV.6.3.3 Analiza immunochemiczna PARP.**

Inkubację z pierwszorzędowym przeciwciałem monoklonalnym mysim IgG C-2-10 w rozcieńczeniu 1:5000 prowadzono przez 2h w temperaturze pokojowej w buforze zawierającym 1% BSA i 0,1% azydek sodu w PBS-T. Następnie po trzykrotnym płukaniu, 3 x 15 minut w buforze PBS-T z 1% BSA membrany były inkubowane przez 1 h w temperaturze pokojowej z drugorzędowym przeciwciałem w

rozcieńczeniu 1:3000 sprzężonym z peroksydazą chrzanową. Kolejno membranę przemywano dwukrotnie buforem PBS-T z 1% BSA i dwukrotnie w buforze PBS-T pozbawionym BSA. Reakcję z substratami dla peroksydazy chrzanowej (zestaw ECL, Amersham) przeprowadzano przez 2 minuty. Kliszę naświetlano 10 minut i wywoływano przy użyciu odczynników firmy Foton. Po wysuszeniu klisza była skanowana, a obraz prążków poddawany analizie densytometrycznej przy użyciu oprogramowania TotalLab 1.1 firmy Phoretix.

#### **IV.7 Ocena ekspresji genu dla PLC $\beta$ metodą hybrydyzacji *in situ*.**

Ekspresję mRNA dla PLC $\beta$  w półkulach mózgu szczura badano metodą hybrydyzacji *in situ*. Zwierzęta dekapitowano, izolowano mózg tak aby nie uszkodzić jego struktury, natychmiast zamrażano w suchym lodzie i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  aż do momentu hybrydyzacji. Przed przystąpieniem do krojenia mózgu na skrawki preparaty ogrzewano do temperatury około  $-20^{\circ}\text{C}$ , która jest utrzymywana przy krojeniu w mikrotomie, przygotowywano skrawki o grubości  $10\mu\text{m}$  i umieszczano je na szkiełku podstawowym. Tak przygotowane preparaty przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Po trzy preparaty z określonego obszaru mózgu używano do hybrydyzacji *in situ* w celu oceny ekspresji mRNA PLC $\beta$ . Mieszaninę oligonukleotydów dla poszczególnych izoform PLC $\beta$  otrzymywano z firmy Perkin-Elmer. Do badań używano następujące sekwencje nukleotydów: PLC $\beta$ 1: 5' CCT GGC ATC CTT GAC GAG GCT GAG ATC TAA CAG CTC CGT CTC CTT 3', PLC $\beta$ 2: 5' AAG TTT CAC GAA CGA TTT CTG TTG CTT GAG CTC TTC AAT GGT CTG 3' i PLC $\beta$ 3: 3' CAA CTT CTG CAA AAT GAG TTT AAT GTG CTC CCG CTT CTG GTA CTT 3'. Połączone oligonukleotydy dla wszystkich izoform PLC $\beta$  znakowano na 3'-końcu radioaktywnym deoxyadenozynotrisfosforanem (dATP $\alpha$ S [ $^{35}\text{S}$ ], 12,5 mCi/ml, Dupont NEN) przy użyciu terminalnej transferazy (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim). Przygotowane preparaty rozmrażano i poddawano pre-hybrydyzacji, czyli utrwalano 5 minut w 4% (v/v) formaldehydzie w buforze PBS, następnie płukano jeden raz w buforze PBS przez 2 minuty. Następnie preparaty pokrywano świeżo przygotowanym roztworem zawierającym 0,25% bezwodnik octowy w 0,1M

trietanoloaminie-HCl/0,09% (w/v) NaCl, pH 8,0 na 10 minut. Z kolei preparaty odwadniano poprzez kolejne płukania w etanolu, 70%, 80%, 95% i 100% i odtłuszczano w chloroformie. Ponownie płukano przez 1 min w 100% i w 95% etanolu i pozostawiano na 15 minut w temperaturze pokojowej. Po wysuszeniu poddawano hybrydyzacji. Bufor do hybrydyzacji zawierał: 4 x SSC (0,6M. NaCl, 0,06M. cytrynian sodu, pH 7,2), 50% formamid (v/v), roztwór Denhardt'a (0,02% Ficoll, 0,02% poliwinylpirolidon, 0,02% BSA), 500µg/ml DNA (pojedyncza nić otrzymana przez denaturację DNA otrzymanego z Boehringer Mannheim, #223646), tRNA (250µg/ml), 10mM DTT i 10% (w/v) dekstran. Na jeden preparat używano 50µl buforu do hybrydyzacji, który zawierał wyznakowane radioaktywnym dATP oligonukleotydy (1 x 10<sup>6</sup> dpm w 50µl buforu). Hybrydyzację przeprowadzano przez całą noc w temperaturze 37°C. Następnie preparaty płukano cztery razy po 15 minut w 2 x SSC/50% formamid w temperaturze 40°C i dwa razy po 30 minut w 1 x SSC w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty płukano przez 20-30 sekund w wodzie destylowanej, zanurzano na 3 minuty w 70% etanolu i suszono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po wysuszeniu preparaty poddawano ekspozycji przez 7-10 dni, używano filmu firmy Kodak (Kodak BioMax MR Film). Film wywoływano i analizowano autoradiogram poprzez pomiar gęstości optycznej w stosunku do standardów.

## **IV.8 Oznaczenie ekspresji genu syntazy tlenku azotu (NOS) metodą RT-PCR.**

### **IV.8.1 Izolacja RNA z kory mózgu.**

Całkowite RNA izolowano w warunkach sterylnych z kory mózgu zgodnie z metodą opisaną przez Chomczyński i Sacchi (1987), zmodyfikowaną, używając odczynnika TRI-reagent (Tel-TEST Inc., Sigma). Tkanekę zawieszano w 1ml odczynnika TRI-reagent, homogenizowano i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie do 1ml homogenatu dodawano 200µl chloroformu, całość wytrząsano przez 15 sekund, a następnie wirowano 9000 x g przez 15 min. w 4°C. Górną fazę wodną zawierającą RNA przenoszono do nowej probówki, dodawano 1ml izopropanolu i intensywnie mieszano. Następnie próby inkubowano w -70°C przez 30 min. Po inkubacji wirowano 9000 x g przez 15 min., a osad RNA trzykrotnie



przemywano 75% etanolem, 0,5ml. Po usunięciu etanolu z próbek osad RNA zawieszano w 50-70 $\mu$ l wody zawierającej 0,1% dietylopirowęglan (DEPC). Następnie mierzono ilość otrzymanego RNA metodą spektrofotometryczną przy długości fali  $\lambda = 260$ , oraz zanieczyszczenie RNA białkami przy długości fali  $\lambda = 280$ . Stosunek  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$  wynosił od 1,6 do 1,9. Ilość RNA oznaczano z następującej zależności:  $A_{260} = 1$  odpowiada 40 $\mu$ g RNA w 1ml.

#### **IV.8.2 Reakcja odwrotnej transkrypcji.**

Całkowite wyizolowane RNA (5 $\mu$ 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 60 min. w mieszaninie zawierającej: 5mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM Tris-HCl, pH 9,0; 0,1% Triton X-100; 1mM dNTP (mieszanina trifosforanów deoksynukleotydów); 1u/ $\mu$ l inhibitora rybonukleazy (RNAsin); 15u/ $\mu$ g odwrotnej transkryptazy (AMV reverse transcriptase); 0,5 $\mu$ g oligo(dT/15) i H<sub>2</sub>O uzupełniająca do końcowej objętości 20 $\mu$ l. W celu inaktywacji odwrotnej transkryptazy mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 5 min. w 90°C, a następnie schładzano przez 5 min. w lodzie.

#### **IV.8.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR).**

Uzyskane cDNA (5 $\mu$ g) amplifikowano metodą PCR używając starterów dla iNOS i nNOS wykonanych przez firmę TIB Molbiol według sekwencji komplementarnych do sekwencji uzyskanych z banku genów. Jednocześnie analizowano poziom ekspresji genu kodującego konstytutywne białko dehydrogenazę fosforanu aldehydu glicerynowego (GAPDH). Mieszanina do wielokrotnego powielania sekwencji DNA (mieszanina PCR) zawierała następujące składniki: 20 $\mu$ l Taq PCR Master MIX Kit (Qiagen, Valencia CA); 2 $\mu$ l (5 $\mu$ g) cDNA oraz 20pmoli każdego ze starterów: starter nNOS-f: TTCCGAAGCTTCTGGCAACA; starter nNOS-r: TTAGGAGCTGAAAACCTCAT; starter iNOS-f TGGGTCTTC GGGCTTCAGGTTATT; starter iNOS-r ACCTGGGGAACACCTGGGGATTT; starter GAPDH-f: TGAAGGTCGGAG TCAACGGATTTGGT i starter GAPDH-r: CATGTGGCCATGAGGTCCACCAC. Każdą próbkę uzupełniano wodą do objętości

50µl. Próbkę cDNA z mieszaniną PCR były inkubowane w aparacie GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) w następujących warunkach: wstępna denaturacja (5min, 94°C, 1 cykl), denaturacja (1min, 94°C), asocjacja starterów (2min, 60°C) i wydłużanie łańcucha (3min, 72°C) 35 cykli i faza końcowego wydłużania łańcucha (7min, 72°C). Produkty PCR (10µl) poddawano elektroforezie w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny w buforze 0,5 x TBE (0,045M Tris-boran, 0,0001M. EDTA) przy natężeniu 100V. Poziom ekspresji białka nNOS badano w odniesieniu do ekspresji genu kodującego białko GAPDH. Obraz zapisywano przy użyciu systemu Nucleovision firmy Nucleotech, zaś analizę densytometryczną prążków przeprowadzano przy pomocy programu GelExpert 4.0.

## **IV.9 Badanie wpływu peptydów Aβ na indukcję czynnika proapoptotycznego w synaptozomach.**

### **IV.9.1 Izolacja DNA.**

Frację synaptozomalną zawieszoną w buforze Locke'a inkubowano 4h w 37°C w atmosferze karbogenu w obecności 50µM zagregowanego Aβ 25-35 lub bez Aβ (kontrola). Po inkubacji synaptozomów otrzymywano cytozol i używano do inkubacji z frakcją jądrową. Następnie cytozol synaptozomalny odwirowywano, a frakcję jądrową używano do izolacji DNA przy użyciu odczynnika do izolacji DNAzol. Lizę frakcji jądrowej prowadzono w 1ml DNAzolu przez 15 min. w temperaturze pokojowej delikatnie mieszając próbki. Następnie lizat wirowano 10000 x g przez 10 min w 4°C. Nadsącz zawierający DNA przenoszono do nowej probówki i dodawano 0,5ml 100% etanolu. Próbkę delikatnie mieszano i pozostawiano na 3 min. w temperaturze pokojowej. Następnie odwirowywano 1000 x g przez 3 min. w temperaturze pokojowej. Nadsącz usuwano, a do wytrąconego DNA dodawano 1ml 96% etanolu. Próbkę mieszano przez odwracanie 3-6 razy i odstawiano na ok. 1 min., aby wytrącone DNA spłynęło na dno probówki. Alkohol usuwano pipetą i płukano ponownie 96% etanolem. Po usunięciu etanolu DNA suszono w probówkach przez 15 min. w temperaturze pokojowej. Wysuszone DNA rozpuszczano w 50µl 8mM NaOH i pozostawiano na 24 godziny w lodówce. Następnie mierzono ilość otrzymanego DNA metodą spektrofotometryczną przy długości fali  $\lambda = 260$ , oraz zanieczyszczenie DNA białkami

przy długości fali  $\lambda = 280$ . Stosunek  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$  wynosił od 1,6 do 1,9. Ilość DNA oznaczano z następującej zależności:  $A_{260} = 1$  odpowiada  $50\mu\text{g}$  DNA w ml. Otrzymane DNA używano do badania jego degradacji metodą elektroforezy na żelu agarozowym.

#### **IV.9.2 Elektroforeza DNA na żelu agarozowym.**

Degradację DNA badano metodą elektroforezy na 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny ( $2\mu\text{l}$  roztworu  $10\text{mg/ml}$  na  $200\text{ ml}$  żelu agarozowego).  $1\mu\text{g}$  wyizolowanego DNA mieszano z kroplą (zwykle  $2\text{-}3\mu\text{l}$ ) buforu obciążającego z barwnikiem (błękit bromofenolowy) i наносzono na żel. Elektroforezę prowadzono w buforze  $0,5 \times \text{TBE}$  przez  $3\text{-}4$  godziny przy napięciu  $60\text{ V}$  na  $\text{cm}$  długości żelu. Żel analizowano przy użyciu aparatu z kamerą NucleoVision i GelExpert 4.0 software z NucleoTech.

#### **IV.10 Oznaczanie napływu [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] do synaptoneurozomów i synaptozomów.**

Zawiesina synaptozomów lub synaptoneurozomów zawierająca  $1\text{ mg}$  białka była preinkubowana przez  $10\text{ min.}$  w łaźni wodnej o temperaturze  $37^\circ\text{C}$  w buforze KRBS w środowisku karbogenu w obecności  $\text{A}\beta$  w  $25\mu\text{M}$  stężeniu lub bez  $\text{A}\beta$  (kontrola). W wybranych eksperymentach synaptoneurozomy były preinkubowane z nimodypiną w stężeniu  $1\text{mM}$  przez  $5\text{ min.}$  i inkubacja była kontynuowana przez kolejne  $10\text{ min.}$  po dodaniu  $\text{A}\beta$ . Mieszanina inkubacyjna zawierała bufor KRBS oraz  $0,1\mu\text{Ci}$  [ $^{45}\text{Ca}$ ]Cl<sub>2</sub> w końcowej objętości  $5\text{ml}$ . Reakcję rozpoczynano przez dodanie do próbek  $1\text{mg}$  preinkubowanych synaptozomów lub synaptoneurozomów i próby inkubowano przez  $30\text{ sekund}$  w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Po inkubacji do próbek dodawano  $5\text{ml}$  zimnego buforu KRBS z  $5\text{mM}$  EGTA. Następnie próby przesączano pod ciśnieniem stosując filtry Whatman GF/B i przepłukiwano  $5\text{ml}$  buforu KRBS. Radioaktywność [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] pozostałego na filtrach oznaczano w scyntylicatorze Bray'a w liczniku scyntylicacyjnym LKB Wallac 1409 stosując czas zliczania  $5\text{ minut}$ .

#### **IV.11 Badanie poziomu wolnych rodników przy użyciu sondy dichlorofluoresceiny (DCF).**

Acetylowana dichloro-dihydrofluoresceina ( $H_2DCF-DA$ ) jest sondą używaną do pomiaru wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego. Acetylowana sonda przechodzi przez błony komórkowe, wewnątrz komórki ulega deacetylacji przez niespecyficzne esterazy i ulega oksydacji w wyniku stresu oksydacyjnego. Utleniona sonda DCF ma właściwości fluorescencyjne. Świeżo wyizolowane synaptozomy były inkubowane w obecności  $15 \mu M H_2DCF-DA$  w buforze Locke'a przez 30 min. w  $37^\circ C$  w ciemności. Następnie wirowane  $14000 \text{ obr./min}$  przez 5 min. i ponownie zawieszono w buforze Locke'a. Synaptozomy inkubowano w obecności  $250 \mu M H_2O_2$  oraz zagregowanych peptydów amyloidu beta:  $A\beta_{25-35}$  i  $1-40$  w stężeniu  $25 \mu M$  w końcowej objętości  $200 \mu l$  przez 4 godz. w atmosferze karbogenu w  $37^\circ C$  w ciemności. Fluorescencję DCF oznaczano przed i po inkubacji przy użyciu spektrofotometru LS-50B przy długości fali pobudzającej  $488 \text{ nm}$  i emitowanej  $530 \text{ nm}$ .

#### **IV.12 Badanie oksydacji lipidów i białek.**

##### **IV.12.1 Pomiar stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS).**

Oksydację lipidów określano poprzez pomiar stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym w tym dialdehydu malonylowego (MDA) w błonach synaptoplazmatycznych (SPM) z kory mózgu wg metody opisanej przez Asakawa i Matsushita (1980). SPM z kory mózgu ( $1 \text{ mg}$  białka) inkubowano w  $1 \text{ ml}$  buforu KRBS z różnymi fragmentami peptydów amyloidu beta ( $A\beta$ ) lub z  $FeCl_2$  przez 60 minut w łaźni wodnej o temperaturze  $37^\circ C$ . Następnie do prób dodawano  $1 \text{ ml}$   $30 \%$  TCA i  $0,1 \text{ ml}$   $5 M$  HCl i wirowano przez 5 minut przy  $1500 \times g$ , nadsącz przenoszono do nowych probówek i dodawano  $1 \text{ ml}$   $0,75 \%$  kwasu tiobarbiturowego (TBA). Próby były inkubowane przez 15 min. w  $100^\circ C$ . Po schłodzeniu prób odczytywano ich absorbancję na spektrofotometrze shimadzu przy długości fali  $\lambda=535 \text{ nm}$  wobec próby ślepej. Do obliczeń stężenia MDA stosowano molowy współczynnik ekstynkcji  $=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### IV.12.2 Oznaczanie ilości grup karbonylowych w białkach.

Oksydację białek w błonach synaptoplazmatycznych oznaczano poprzez pomiar poziomu grup karbonylowych w białkach przy użyciu 2,4-dinitrofenylohydrazyny zgodnie z metodą opisaną przez Levine i wsp., 1990. 2,4-dinitrofenylohydrazyna (DNPH) reaguje z grupami karbonylowymi białek. Powstające 2,4-dinitrofenylohydrazony mają charakterystyczne żółte zabarwienie i ich stężenie może być oznaczane kolorymetrycznie. Natężenie żółtej barwy jest wprost proporcjonalne do stężenia 2,4-dinitrofenylohydrazonów. Błony synaptoplazmatyczne z kory mózgu i hipokampa (1mg białka) inkubowano z zagregowanym A $\beta$  1-42 w stężeniu 25 $\mu$ M przez 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Następnie próby przenoszono do lodu i dodawano taką samą objętość 20% zimnego kwasu trójchlorooctowego (TCA) w celu wytrącenia białka. Próby wirowano przez 15 min. przy 10000 x g. Nadsącz usuwano, a do osadu dodawano 500 $\mu$ l 10mM DNPH w 2M kwasie solnym (HCl). Następnie próby inkubowano 1 godzinę w temperaturze pokojowej mieszając co 10 minut. Po inkubacji wytrącano białko dodając do prób 500 $\mu$ l 20% zimnego TCA i wirowano przez 3 minuty przy 11000 x g. Otrzymany osad płukano trzykrotnie 1ml mieszaniny: 96% etanol/octan etylu (1/1, v/v). Po ostatnim płukaniu osad rozpuszczano w 600 $\mu$ l 6M guanidyny w 20mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, nierozpuszczalny osad odwirowywano przez 3 min. przy 11000 x g. Następnie przeprowadzono pomiar spektrofotometryczny przy długości fali  $\lambda=370$  nm wobec próby ślepej. Do obliczeń stężenia pochodnych guanidyny stosowano molowy współczynnik absorpcji, który wynosi 22000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### IV.13 Inne oznaczenia.

Zawartość białka w próbkach oznaczano przy użyciu fenolowego odczynnika Folin'a według procedury opisaną przez Lowry'ego i wsp., 1951.

#### IV.14 Pomiary radioaktywności badanych prób.

Radioaktywność prób, zawierających roztwory wodne, mierzono używając 8ml mieszaniny scyntylicyjnej, przygotowywanej wg procedury opisaną przez Bray'a (1960). Stosunek objętościowy próby do scyntylatora wynosił 1:16-1:20.

Radioaktywność próbek zawierających związki organiczne mierzono przy użyciu scyntylatora toluenowego. Radioaktywność próbek znakowanych izotopami  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$  i  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  mierzono w liczniku scyntylacyjnym LKB Wallac 1409, stosując czas zliczania 1 minutę lub 5 minut.

#### **IV.15 Statystyczne opracowanie wyników.**

Każde oznaczenie wykonywano w trzech powtórzeniach. Za ostateczny wynik przyjmowano wartość średnią  $\pm$  odchylenie standardowe (SD) obliczone z indywidualnych pomiarów (średnich z powtórzeń). W celu ustalenia wiarygodności zaistniałych różnic w badaniach porównawczych, wartości z poszczególnych eksperymentów weryfikowano wieloczynnikową analizą wariancji (ANOVA) z użyciem testu post-hoc Newmana-Keuls. Wyniki uznawano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności  $p$  poniżej 0,05.

## V WYNIKI

### V.1 Regulacja aktywności ChAT. Wpływ A $\beta$ i związków towarzyszących w mózgach dojrzałych i starczych.

Celem podjętych doświadczeń było zbadanie modulacji aktywności ChAT przez peptydy A $\beta$  oraz wybrane związki towarzyszące tym peptydom w mózgach dojrzałych i starczych. Badania przeprowadzono na mózgach zwierząt dorosłych, 4-miesięcznych, dorosłych-starych, 14-miesięcznych oraz starych, 24-miesięcznych. Aktywność ChAT oznaczono metodą radiochemiczną z użyciem egzogennych substratów: choliny i znakowanego [ $^{14}$ C]acetylokoenzymu A. Stwierdzono, że 70% całkowitej aktywności enzymu występuje w cytozolu, a współczynnik wzbogacenia frakcji cytozolowej wynosi 6,5. Najwyższą aktywność zaobserwowano w prążkowie, następnie korze mózgu i hipokampie, wynosiła ona odpowiednio  $1,605 \pm 0,081$ ,  $0,533 \pm 0,058$  i  $0,158 \pm 0,020$  nmoli powstałej acetylocholino/mg białka/min (średnia  $\pm$  SD z 3-5 niezależnych doświadczeń). Aktywność tego enzymu zależy od ilości białka i czasu inkubacji. Zależność ta jest prostoliniowa w obecności białka w granicach 15 – 100 $\mu$ g oraz w czasie inkubacji 5 – 25 minut. Optymalne stężenie substratów wynosi: 10mM bromek choliny oraz 0,5mM acetylokoenzym A. Aktywność ChAT nie ulegała zmianie w obecności kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) w stężeniu 1-20mM oraz w obecności CaCl $_2$  w stężeniu 0,1-1mM. Inhibitory kinaz białkowych: PKC, PKA i PKG (H-7, H-8 i H-9) oraz inhibitor fosfatazy 2A (cyklosporyna A) również pozostawały bez wpływu na aktywność enzymu (**Tabela I**).

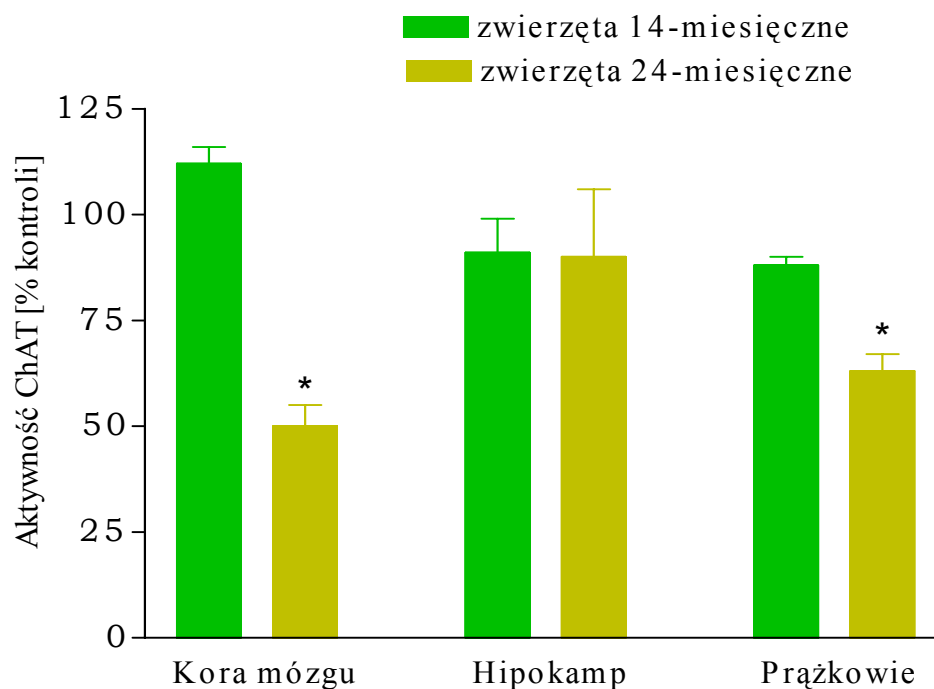
**Tabela I. Udział wapnia, inhibitorów kinaz białkowych oraz fosfatazy 2A w regulacji acetylotransferazy cholinowej (ChAT).**

Badany związek	Stężenie	Aktywność ChAT [% kontroli]
EDTA	1,0mM	99 ± 5
	10mM	96 ± 4
	20mM	103 ± 1
CaCl <sub>2</sub>	0,1mM	100 ± 2
	0,5mM	99 ± 2
	1,0mM	97 ± 4
<b>Inhibitory kinaz białkowych</b>		
H-7	0,01mM	95 ± 28
H-8	0,01mM	101 ± 30
H-9	0,01mM	100 ± 34
Cyklosporyna A	0,01mM	105 ± 30

*Aktywność ChAT oznaczano w homogenacie z kory mózgu zwierząt dorosłych. Wartości przedstawione w procentach kontroli są średnimi z trzech niezależnych eksperymentów ± SD. Znamienność badano metodą ANOVA.*



Aktywność acetylotransferazy cholinowej podlega natomiast istotnym zmianom w procesie starzenia. Znamienne obniżenie aktywności ChAT zaobserwowano w korze mózgu i prążkowie u zwierząt 24-miesięcznych w stosunku do zwierząt 4-miesięcznych odpowiednio o 50% i 37%. W hipokampie zwierząt starych oraz w mózgach zwierząt 14-miesięcznych aktywność ChAT pozostawała bez zmian (**Rycina 11**).

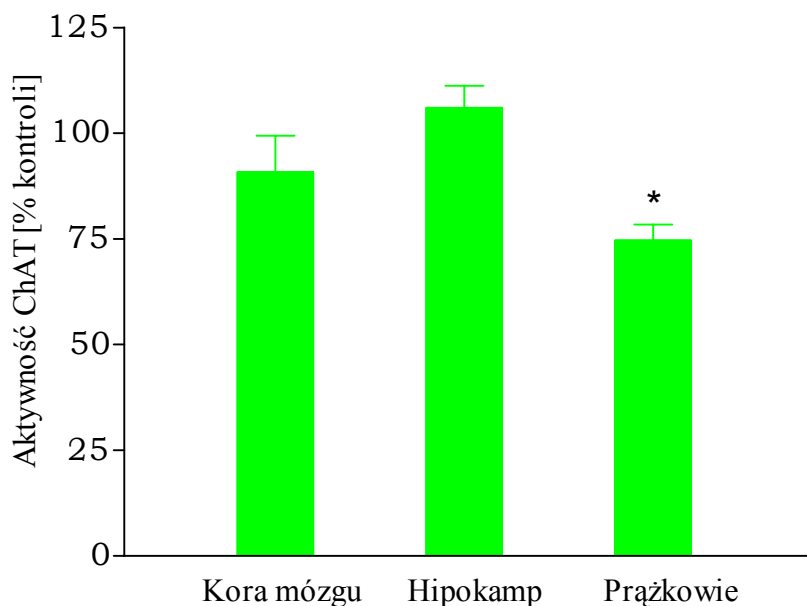


**Rycina 11. Aktywność acetylotransferazy cholinowej (ChAT) w korze mózgu, prążkowie i hipokampie w procesie starzenia.**

Wartości przedstawiają procenty odpowiednich kontroli, za wartość kontrolną uznano aktywność ChAT w poszczególnych strukturach mózgu u zwierząt 4-miesięcznych, która wynosiła:  $0,533 \pm 0,058$  w korze mózgu,  $1,605 \pm 0,081$  w prążkowie i  $0,158 \pm 0,020$  w hipokampie (nmole powstałej acetylocholin/mg białka/min). Przedstawione dane są średnimi  $\pm$  SD z 3-5 niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Znamienność oznaczono przy użyciu testu *t*. \* $p < 0.05$  w stosunku do kontroli.

Długołańcuchowy peptyd A $\beta$  1-42 w formie zagregowanej w zakresie stężeń 25-100 $\mu$ M oraz jego neurotoksyczny fragment A $\beta$  25-35 nie wpływa na aktywność ChAT w korze mózgu, hipokampie i prążkowie u zwierząt dorosłych (dane nie prezentowane).

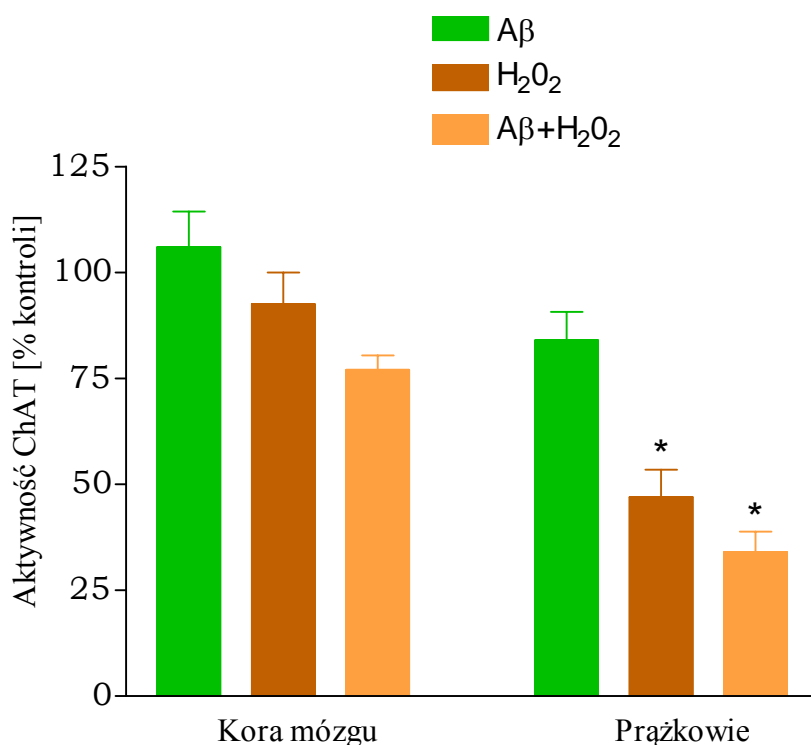
Agregowany A $\beta$  25-35 obniża aktywność ChAT o około 20% wyłącznie w prążkowie u zwierząt starych (**Rycina 12**).



**Rycina 12.** Zmiany w aktywności acetylotransferazy cholinowej (ChAT) w korze mózgu, hipokampie i prążkowie u zwierząt starych w wyniku działania agregowanego A $\beta$  25-35.

Skrawki z kory mózgu, prążkowie lub hipokampa zwierząt starych inkubowano w buforze Krebsa-Ringera (pH 7,4) przez 1 godzinę w temperaturze 37°C w środowisku karbogenicznym (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>) z A $\beta$  25-35 w 25 $\mu$ M stężeniu lub bez A $\beta$  (kontrola). Po inkubacji skrawki homogenizowano i oznaczano aktywność ChAT. Wyniki przedstawione w procentach kontroli są wartościami z trzech do ośmiu niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność badano przy użyciu testu t dla danych sparowanych, \* $p < 0,05$ .

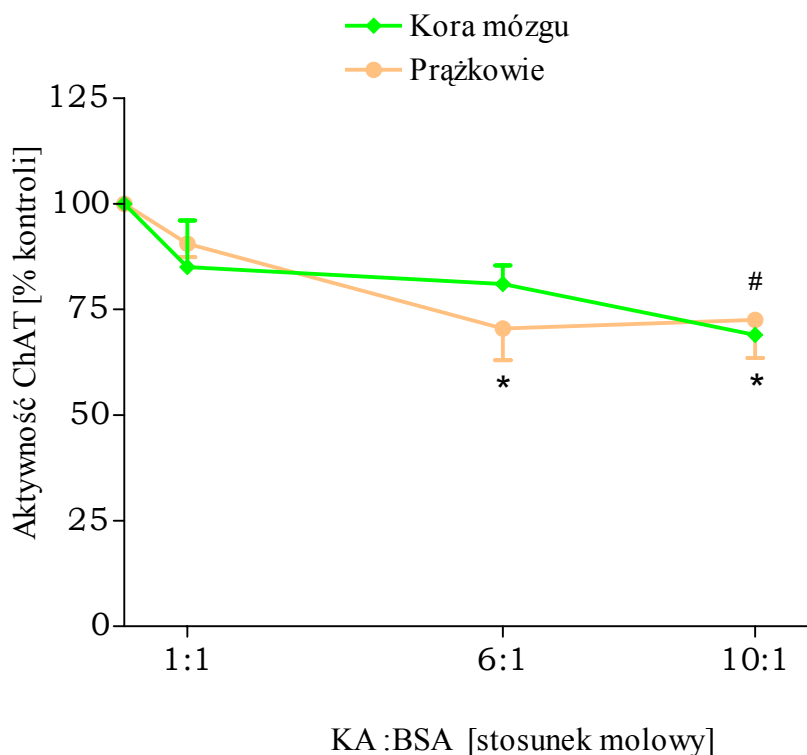
Zagregowany A $\beta$  1-40 obniża aktywność ChAT w prążkowie zwierząt 24-miesięcznych o 40% ( $59,00 \pm 3,46$ , średnia z trzech oznaczeń  $\pm$  SD, % kontroli). W celu wyjaśnienia mechanizmu działania peptydów A $\beta$  na aktywność ChAT zbadano wpływ procesów wolnorodnikowych na ten enzym, mając na uwadze fakt, że A $\beta$  powoduje ich aktywację. Procesy wolnorodnikowe wywołane działaniem nadtlenu wodoru (1mM H $_2$ O $_2$ ) powodują inhibicję enzymu w prążkowie, a pozostają bez wpływu na jego aktywność w korze mózgu (**Rycina 13**).



**Rycina 13. Udział nadtlenu wodoru (H $_2$ O $_2$ ) oraz agregowanego A $\beta$  25-35 w modulacji aktywności acetylotransferazy cholinowej (ChAT) w korze mózgu i prążkowie u zwierząt dorosłych.**

Skrawki z kory mózgu lub z prążkowie zwierząt starych inkubowano w buforze Krebsa-Ringera (pH 7,4) przez 1 godzinę w temperaturze 37°C w środowisku karbogenu (95%O $_2$ /5%CO $_2$ ) bez A $\beta$  i H $_2$ O $_2$  (kontrola) lub z H $_2$ O $_2$  w 1mM stężeniu i A $\beta$  25-35 w 25 $\mu$ M stężeniu lub w obecności tych dwu czynników razem. Po inkubacji skrawki homogenizowano i oznaczano aktywność ChAT. Wyniki przedstawione w procentach kontroli są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keuls, \* $p < 0.01$  w stosunku do kontroli.

A $\beta$  25-35 nie potęguje hamowania wywołanego wodą utlenioną w prążkowie. Istotnym czynnikiem modulującym aktywność ChAT jest kwas arachidonowy (KA), który w obecności 0,1% albuminy (BSA) znamiennie obniża aktywność enzymu w prążkowie oraz w korze mózgu (**Rycina 14**).



**Rycina 14. Modulacja aktywności acetylotransferazy cholinowej (ChAT) w korze mózgu i prążkowie u zwierząt dorosłych przez kwas arachidonowy (KA).**

Cytosol z kory mózgu i prążkowie zwierząt dorosłych inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C z kwasem arachidonowym w stężeniu od 15  $\mu$ M do 150  $\mu$ M w obecności 15  $\mu$ M albuminy z surowicy wołu pozbawionej wolnych kwasów tłuszczowych (BSA). Kontrolą była frakcja cytozolowa inkubowana z 15  $\mu$ M BSA bez KA. Po inkubacji oznaczano aktywność ChAT. Wyniki przedstawione w procentach kontroli są wartościami z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli w prążkowie, # $p < 0,05$  w stosunku do kontroli w korze mózgu.

W kolejnych badaniach uwzględniono związki, które towarzyszą peptydom A $\beta$  odkładanym w postaci płytek starczych. Zaobserwowano, że apolipoproteina E4 (apoE4) w stężeniu 0,5 $\mu$ M obniża aktywność ChAT w prążkowie u zwierząt dorosłych, a pozostaje bez wpływu na ten enzym w korze mózgu (**Tabela II**). Homocysteina w stężeniu 1mM nie wpływa na enzym (dane nie prezentowane).

**Tabela II. Udział apoE4 w modulacji aktywności ChAT w korze mózgu i prążkowie u zwierząt dorosłych.**

Aktywność ChAT [nmol/mg białka/min] (% kontroli)		
	Kora mózgu	Prążkowie
<b>Kontrola</b>	0,438 $\pm$ 0,007 (100)	1,053 $\pm$ 0,032 (100)
<b>ApoE4 (0,5<math>\mu</math>M)</b>	0,469 $\pm$ 0,004 (107)	0,873 $\pm$ 0,056 (83) (*)

*Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \* $p$ <0,05 w stosunku do kontroli*

FeCl<sub>2</sub> w stężeniu 20-100 $\mu$ M pozostaje bez wpływu na aktywność ChAT w korze mózgu, natomiast w 1000 $\mu$ M stężeniu obniża aktywność enzymu w tej strukturze mózgu. Jony żelaza stymulują oksydację lipidów i białek w badanym zakresie stężeń. Badania te miały posłużyć lepszemu zrozumieniu roli procesów wolnorodnikowych w modulacji aktywności ChAT. Uzyskane wyniki wskazują na brak zależności pomiędzy stopniem aktywności procesów wolnorodnikowych badanych poprzez oksydację lipidów i białek, a aktywnością ChAT (**Tabela III**).

**Tabela III. Charakterystyka działania  $FeCl_2$  na aktywność ChAT i procesy oksydacji lipidów i białek w korze mózgu.**

	Aktywność ChAT [nmol/mg białka/min] (% kontroli)	TBARS [nmol/mg białka] (% kontroli)	Grupy karbonylowe [nmol/mg białka] (% kontroli)
<b>Kontrola</b>	0,438 ± 0,007	2,466 ± 0,119	0,841 ± 0,032
<b>FeCl<sub>2</sub></b>			
<b>20μM</b>	0,441 ± 0,009 (101)	15,793 ± 1,010 (*) (645)	1,773 ± 0,643 (210)
<b>100μM</b>	0,424 ± 0,003 (97)	17,715 ± 1,424 (*) (718)	2,409 ± 0,276 (*) (286)
<b>1000μM</b>	0,317 ± 0,002 (*) (72)	9,122 ± 1,221 (*) (370)	2,424 ± 0,224 (*) (288)

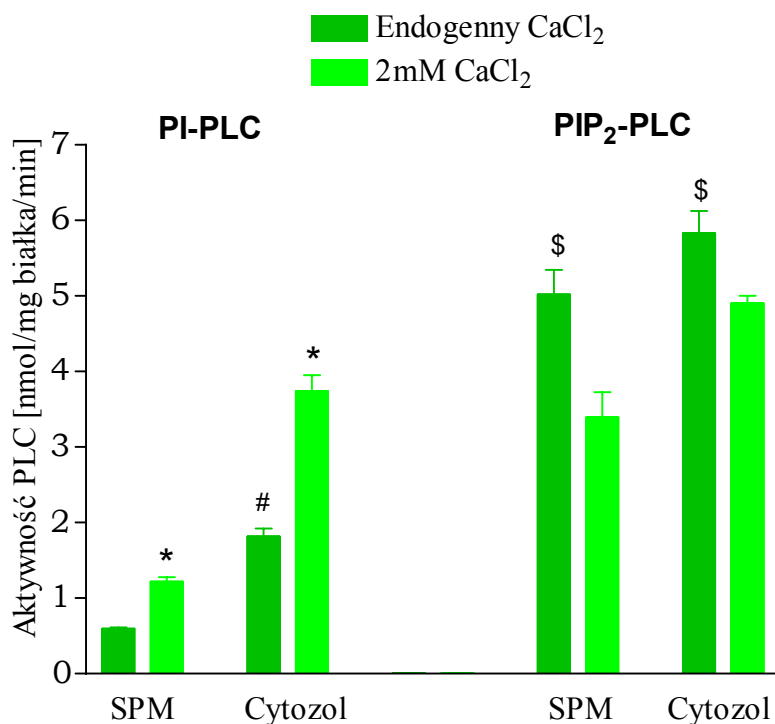
Homogenat z kory mózgu inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 min w łaźni wodnej. Następnie oznaczono aktywność ChAT, poziom związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) oraz oksydację białek mierzoną poprzez pomiar poziomu grup karbonylowych. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia ± SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli.

## V.2 Modyfikacja przez Aβ niezależnej i zależnej od receptora cholinergicznego aktywności PIP<sub>2</sub>-PLC i PARP.

W celu określenia roli peptydów Aβ w zaburzeniu przekazywania informacji na drodze degradacji fosfolipidów inozytolowych przez PLC zbadano wpływ Aβ na degradację fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP<sub>2</sub>) zależną od pobudzenia receptora cholinergicznego i białek G. Ponadto zbadano udział peptydów Aβ w modulacji aktywności PARP jako jądrowego odbiorcy informacji na szlaku przemian fosfoinozytydów.

### V.2.1 Wpływ peptydów A $\beta$ na podstawową i zależną od pobudzenia receptora cholinergicznego i białek G aktywność PLC.

Uzyskane wyniki badań wykazały i potwierdziły, że istnieją dwie drogi degradacji fosfolipidów inozytolowych, zależna od wapnia degradacja fosfatydyloinozytolu (PI) przez PI-PLC oraz zależna od pobudzenia receptora cholinergicznego i aktywacji białek G degradacja fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP<sub>2</sub>) z udziałem PIP<sub>2</sub>-PLC. Zaobserwowano, że PI-PLC wykazuje czterokrotnie wyższą aktywność w cytozolu w stosunku do frakcji błon synaptoplazmatycznych (SPM). Aktywność PI-PLC zależy od stężenia wapnia. W obecności 2mM EGTA aktywność PI-PLC jest nie wykrywalna. CaCl<sub>2</sub> w 2mM stężeniu stymuluje błonową i cytozolową formę enzymu o około 100% w porównaniu do aktywności enzymu w obecności endogennych stężeń CaCl<sub>2</sub> (Rycina 15).



**Rycina 15. Udział jonów wapnia w regulacji aktywności fosfolipazy C degradującej fosfatydyloinozytol (PI-PLC) oraz fosfolipazy C degradującej fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP<sub>2</sub>) w błonach synaptoplazmatycznych i cytozolu.**

Z kory mózgowej z hipokampami izolowano błony synaptoplazmatyczne (SPM) oraz cytozol. Następnie oznaczano aktywność PI-PLC oraz PIP<sub>2</sub>-PLC w tych frakcjach subkomórkowych w obecności CaCl<sub>2</sub> w 2mM stężeniu lub bez wapnia. Przedstawione dane są wartościami z pięciu niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach

(średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newman-Keulsa, \* $p < 0,05$  w stosunku do aktywności PI-PLC badanej bez wapnia, # $p < 0,05$  w stosunku do aktywności PI-PLC w błonach synaptoplazmatycznych, \$ $p < 0,05$  w stosunku do aktywności PI-PLC.

Pobudzenie receptora muskarynowego układu cholinergicznego i białek G nie wpływa na aktywność PI-PLC (Tabela IV).

**Tabela IV. Wpływ  $\text{CaCl}_2$  oraz pobudzenia receptora muskarynowego i białek G na aktywność fosfolipazy C degradującej PI (PI-PLC) oraz fosfolipazy C degradującej  $\text{PIP}_2$  ( $\text{PIP}_2$ -PLC)**

Aktywność PLC [nmol/mg białka/min] (% kontroli)		
	PI-PLC	$\text{PIP}_2$ -PLC
<b>Kontrola</b>	0,682 $\pm$ 0,069 (100)	3,829 $\pm$ 0,244 (100)
<b>1mM Karbachol</b>	0,640 $\pm$ 0,005 (94)	3,987 $\pm$ 0,386 (104)
<b>1mM Karbachol 100<math>\mu</math>M GTP(<math>\gamma</math>)S</b>	0,481 $\pm$ 0,034 (70)	5,056 $\pm$ 0,206 (132) (*)
<b>2mM <math>\text{CaCl}_2</math></b>	2,747 $\pm$ 0,018 (403) (*)	3,313 $\pm$ 0,215 (86)
<b>2mM <math>\text{CaCl}_2</math> 1mM Karbachol</b>	2,891 $\pm$ 0,065 (424) (*)	3,839 $\pm$ 0,447 (100)
<b>2mM <math>\text{CaCl}_2</math> 100<math>\mu</math>M GTP(<math>\gamma</math>)S 1mM Karbachol</b>	2,585 $\pm$ 0,096 (379) (*)	4,816 $\pm$ 0,350 (125) (*)

Z kory mózgowej z hipokampami izolowano błony synaptoplazmatyczne (SPM) i oznaczano aktywność PI-PLC oraz  $\text{PIP}_2$ -PLC w obecności badanych związków. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newman-Keulsa, \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli.

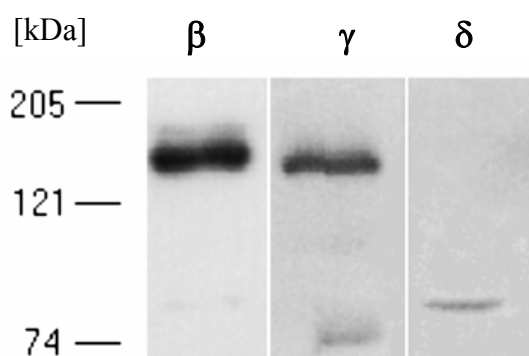


PIP<sub>2</sub>-PLC nie jest regulowana przez CaCl<sub>2</sub>, wykazuje zbliżoną aktywność w obecności 2mM EGTA, 2mM CaCl<sub>2</sub> i w endogennym stężeniu wapnia. Aktywność PIP<sub>2</sub>-PLC wzrasta w wyniku pobudzenia muskarynowego receptora cholinergicznego i białek G. Aktywność PI-PLC i PIP<sub>2</sub>-PLC zależy od pH, stężenia białka i substratu oraz od czasu inkubacji. PI-PLC osiągała najwyższą aktywność w pH 7,8 w obecności 20nmoli PI i 100μg białka po 30min inkubacji. Maksymalną aktywność PIP<sub>2</sub>-PLC zaobserwowano w pH 6,6 po 15 minutach inkubacji w obecności 10nmoli PIP<sub>2</sub> i 50μg białka. Regulowana przez białka G PIP<sub>2</sub>-PLC to izoforma β. PLCδ w głównej mierze degraduje PI i jej aktywność zależy od jonów wapnia. Badania immunochemiczne w hipokampie z przeciwciałami specyficznymi przeciwko izoformie PLCβ, γ i δ wykazały najwyższą immunoreaktywność PLCβ w stosunku do pozostałych izoform (Tabela V).

**Tabela V. Immunoreaktywność izoform fosfolipazy C w hipokampie.**

Immunoreaktywność PLC [gęstość optyczna]			
Izoforma PLC	PLCβ	PLCγ	PLCδ
	3300 ± 580	1717 ± 310	457 ± 33

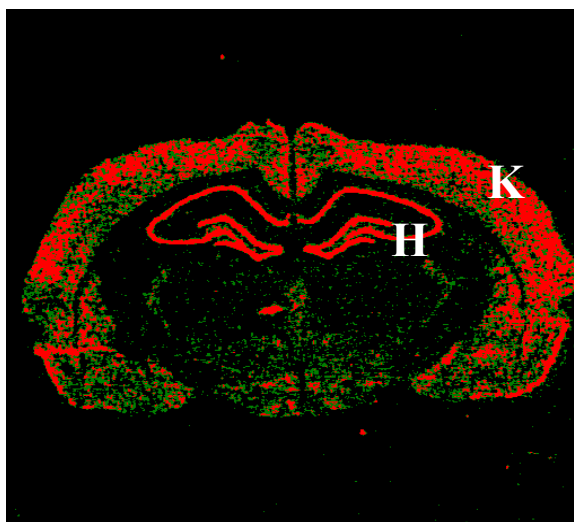
**Zdjęcie reprezentatywne Western blotu z jednego wybranego doświadczenia**



Zawiesinę skrawków z hipokampa mieszano z buforem do próbek w stosunku objętościowym 1:1, inkubowano 5 min. w temp. 95 °C i poddawano elektroforezie na żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE. Rozdzielone białka przenoszono na błonę nitrocelulozową Hybond-Extra C (Amersham) i blokowano 1 godz. w temp. pokojowej w buforze PBS-T z 5% odtłuszczonym mlekiem. Kolejno inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem monoklonalnym przeciwko PLCβ, γ i δ (santa Cruz Biotechnology, Inc.) w rozcieńczeniu 1:500 i po trzykrotnym płukaniu w buforze PBS-T inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem typu IgG sprzężonym z peroksydazą

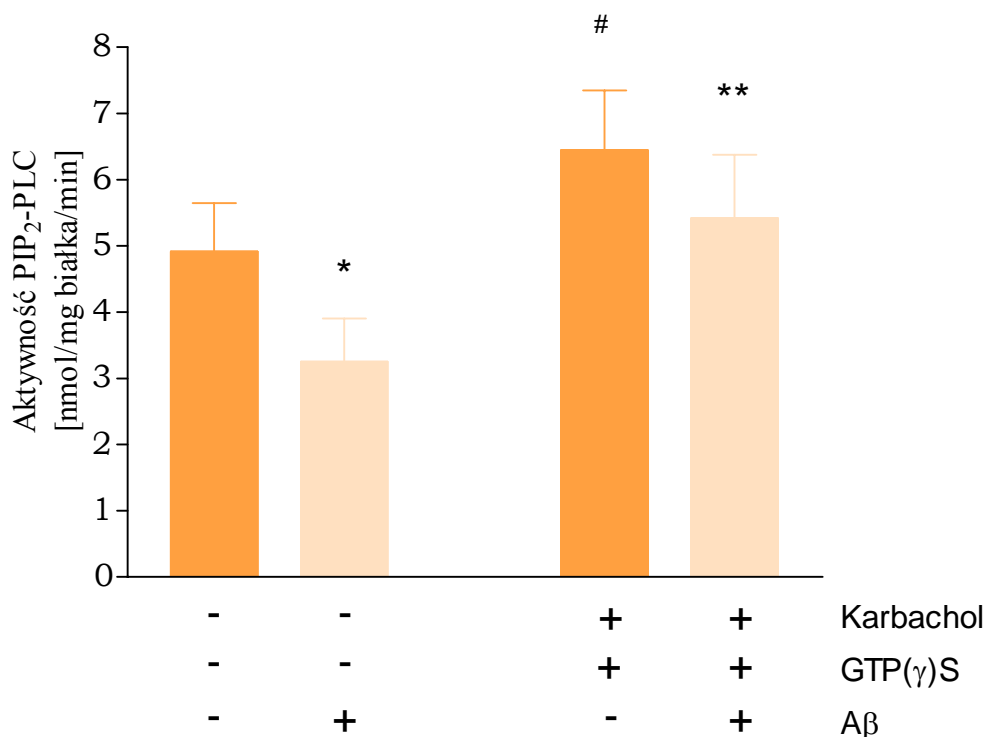
chrzanową w rozcieńczeniu 1:8000. Intensywność prążków oceniano densytometrycznie. Dane w tabeli są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń (średnia  $\pm$  SD).

Badania ekspresji mRNA genu kodującego PLC $\beta$  metodą hybrydyzacji *in situ* wykazały, że ta forma enzymu jest bogato reprezentowana w hipokampie i w korze mózgu (**Rycina 16**).



**Rycina 16. Reprezentatywny obraz hybrydyzacji *in situ* dla PLC $\beta$ .**  
*K- Kora mózgu; H- Hipokamp;*

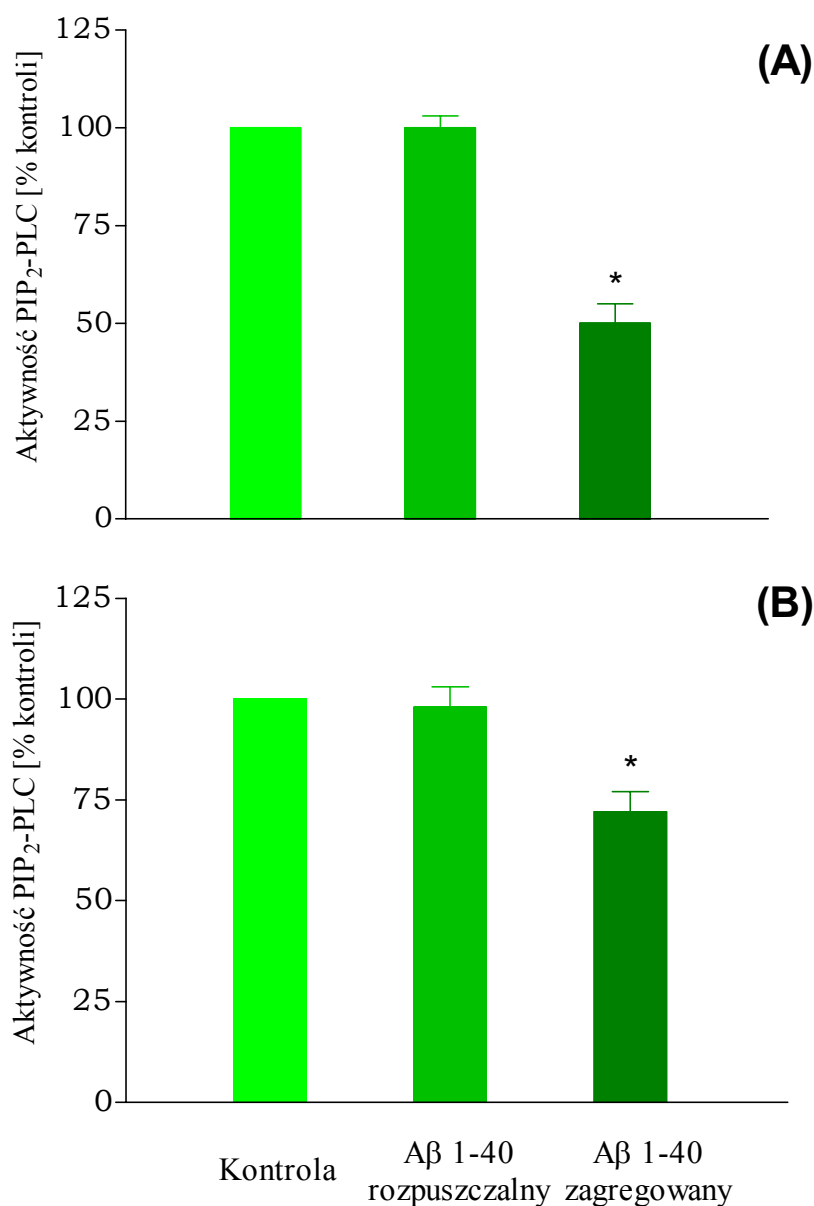
W celu zbadania udziału peptydów A $\beta$  w zaburzeniu degradacji PIP $_2$  i w wytwarzaniu wtórnych przekaźników informacji IP $_3$  i DAG do badań użyto frakcji błon synaptoplazmatycznych oraz egzogenego substratu, radioaktywnego fosfatydylo[ $^3$ H]inozytolo-4,5-bisfosforanu. Stwierdzono, że A $\beta$  25-35 w 25 $\mu$ M stężeniu poddany agregacji obniża aktywność PIP $_2$ -PLC o około 30% niezależnie od pobudzenia receptora cholinergicznego i białek G oraz o około 20% po pobudzeniu receptora i białek G (**Rycina 17**).



**Rycina 17. Aktywność fosfolipazy C degradującej fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP<sub>2</sub>) pod wpływem agregowanego Aβ 25-35 w błonach synaptoplazmatycznych.**

Oznaczano podstawową aktywność PIP<sub>2</sub>-PLC w nieobecności karbacholu i GTP(γ)S lub w obecności karbacholu w stężeniu 1mM i GTP(γ)S w stężeniu 100μM. W obydwu grupach przeprowadzono inkubację w obecności agregowanego Aβ 25-35 w 25μM stężeniu lub bez Aβ. Dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia ± SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, #*p*<0,05 w stosunku do aktywności PIP<sub>2</sub>-PLC podstawowej bez karbacholu i GTP(γ)S, \**p*<0,05; w stosunku do aktywności PIP<sub>2</sub>-PLC oznaczanej bez Aβ.

Świeżo rozpuszczone peptydy Aβ 25-35 pozostawały bez wpływu na aktywność PIP<sub>2</sub>-PLC (dane nie prezentowane). Długołańcuchowy peptyd Aβ 1-40 w formie zagregowanej powoduje 50% inhibicję aktywności konstytutywnej PIP<sub>2</sub>-PLC nie stymulowanej karbacholem i GTP(γ)S (**Rycina 18 A**) oraz 30% inhibicję aktywności enzymu zależnej od receptora i białek G (**Rycina 18 B**).



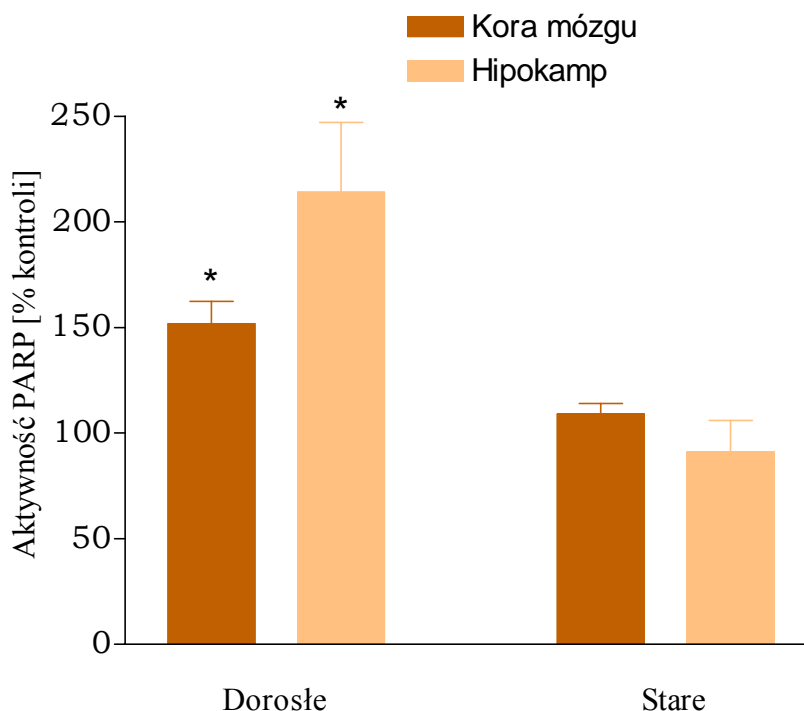
**Rycina 18. Regulacja aktywności konstytutywnej PIP<sub>2</sub>-PLC (Rycina A) oraz zależnej od pobudzenia receptora cholinergicznego (Rycina B) przez peptydy Aβ 1-40.**

Z kory mózgowej z hipokampami izolowano błony synaptoplazmatyczne. Następnie oznaczano aktywność PIP<sub>2</sub>-PLC konstytutywną (w nieobecności karbacholu i GTP( $\gamma$ )S, (Rycina A) lub w obecności karbacholu w stężeniu 1mM i GTP( $\gamma$ )S w stężeniu 100 $\mu$ M (Rycina B). W obydwu grupach przeprowadzono inkubację w obecności rozpuszczalnego lub zagregowanego Aβ 1-40 w 25 $\mu$ M stężeniu lub bez Aβ. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \* $p$ <0,05 w stosunku do kontroli (aktywność PIP<sub>2</sub>-PLC oznaczona bez Aβ).

A $\beta$  1-40 w formie rozpuszczalnej podobnie jak A $\beta$  25-35 nie wpływa na fosfolipazę C degradującą PIP<sub>2</sub>. Zagregowany A $\beta$  1-40 poprzez inhibicję PIP<sub>2</sub>-PLC obniża uwalnianie DAG i IP<sub>3</sub>. Analiza procentowego udziału inozytolo fosforanów w całkowitej puli wodnorozpuszczalnych metabolitów inozytolu wykazała, że A $\beta$  1-40 nie wpływa na aktywność 5-fosfatazy inozytolo-1,4,5-trisfosforanu (dane nie prezentowane).

### **V.2.2 Zależna od pobudzenia receptora cholinergicznego i białek G oraz działania A $\beta$ aktywność PARP.**

Celem podjętych doświadczeń było zbadanie wpływu pobudzenia układu cholinergicznego na aktywność enzymu jądrowego PARP oraz udziału peptydów A $\beta$  w modulacji aktywności konstytutywnej tego enzymu jak również w wyniku aktywacji układu cholinergicznego. Badania przeprowadzone zostały na skrawkach z kory mózgu i hipokampa. Do badań pomiaru aktywności ADP-rybozylacji białek przez PARP użyto radioaktywny substrat [<sup>14</sup>C]NAD. Zaobserwowano, że 1mM karbachol i 100 $\mu$ M GTP( $\gamma$ )S wywołuje około 50% wzrost aktywności PARP-u w korze mózgu oraz o około 100% stymulację enzymu w hipokampie u zwierząt dorosłych. Pobudzenie receptora muskarynowego nie wpływa na aktywność PARP u zwierząt starych (**Rycina 19**).



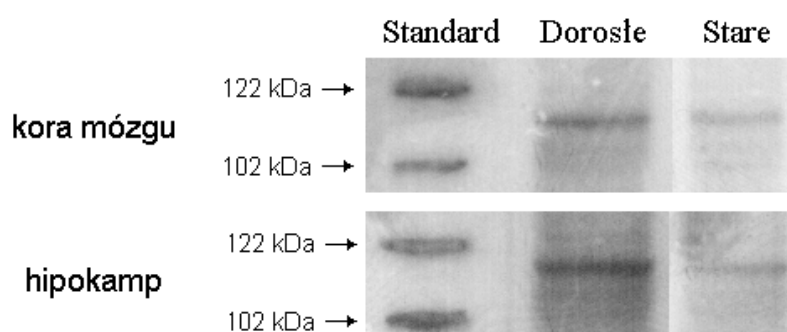
**Rycina 19. Aktywność polimerazy (poli-ADP)rybozy (PARP) w korze mózgu i hipokampie u zwierząt dorosłych i starych podczas pobudzenia receptora cholinergicznego.**

Skrawki z kory mózgu lub z hipokampa zwierząt dorosłych i starych stabilizowano w buforze Krebs-Henseleit (pH 7,4) przez 30 minut w temperaturze 37°C w środowisku karbogenicznym (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>). Następnie do wszystkich prób dodawano CaCl<sub>2</sub> tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 2mM i inkubację kontynuowano przez 30 min z karchacholem w stężeniu 1mM i GTP(γ)S w stężeniu 100μM lub bez pobudzenia receptora muskarynowego (kontrola). Po inkubacji skrawki homogenizowano i oznaczano aktywność PARP. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia ± SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \**p*<0,05 w stosunku do kontroli.

U zwierząt starych w hipokampie zaobserwowano obniżenie poziomu białka PARP o 20%, a w korze mózgu o 40% w stosunku do zwierząt dorosłych (Tabela VI).

**Tabela VI. Poziom białka PARP w korze mózgu i hipokampie u zwierząt dorosłych i starych.**

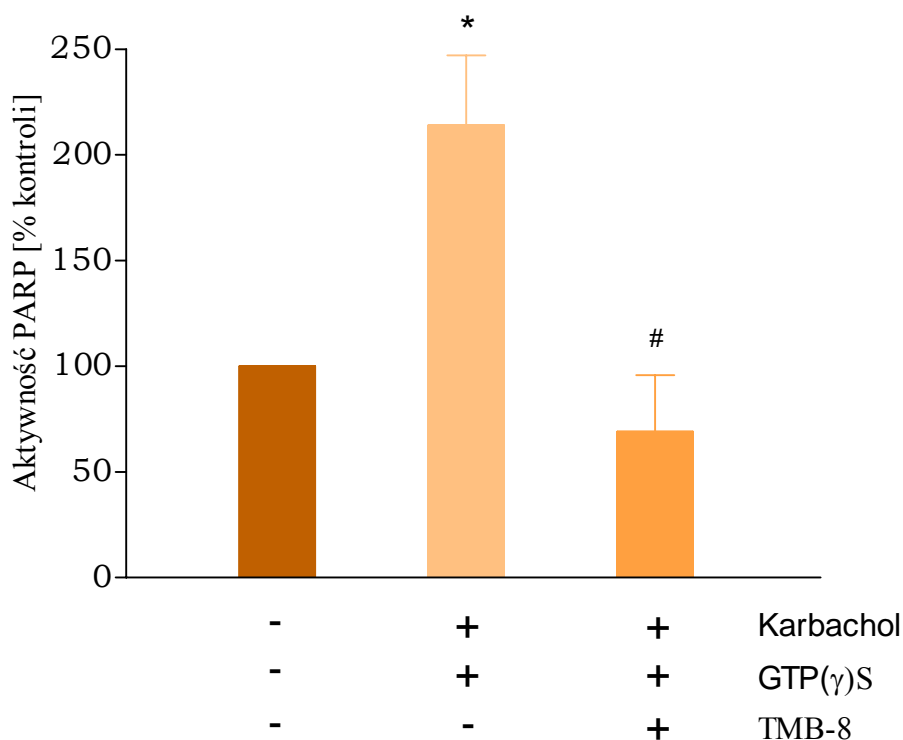
PARP [gęstość optyczna] (% kontroli)		
	Dorosłe	Stare
<b>Kora mózgu</b>	11893 ± 684 (100)	7246 ± 1692 (60) (*)
<b>Hipokamp</b>	15892 ± 1483 (100)	12920 ± 1067 (80) (*)



**Zdjęcie reprezentatywne Western blotu z jednego wybranego doświadczenia**

Homogenat z kory mózgu i hipokampa zwierząt dorosłych i starych mieszano z buforem do próbek w stosunku objętościowym 1:1, inkubowano 5 min. w temp. 95 °C i poddawano elektroforezie na żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE. Rozdzielone białka przenoszono na błonę PVDF (BioRad) i blokowano 1 godz. w temp. pokojowej w buforze PBS-T z 5% odtłuszczonym mlekiem. Następnie inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem monoklonalnym mysim w rozcieńczeniu 1:5000 i po trzykrotnym płukaniu w buforze PBS-T inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem sprzężonym z peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:3000. Intensywność prążków oceniano densytometrycznie. Dane w tabeli są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń (średnia ± SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \* $p < 0,05$  w stosunku do zwierząt dorosłych.

Zablokowanie receptora dla  $IP_3$  przez 100  $\mu$ M TMB-8 likwiduje aktywację PARP-u w hipokampie wywołaną pobudzeniem receptora muskarynowego (**Rycina 20**).

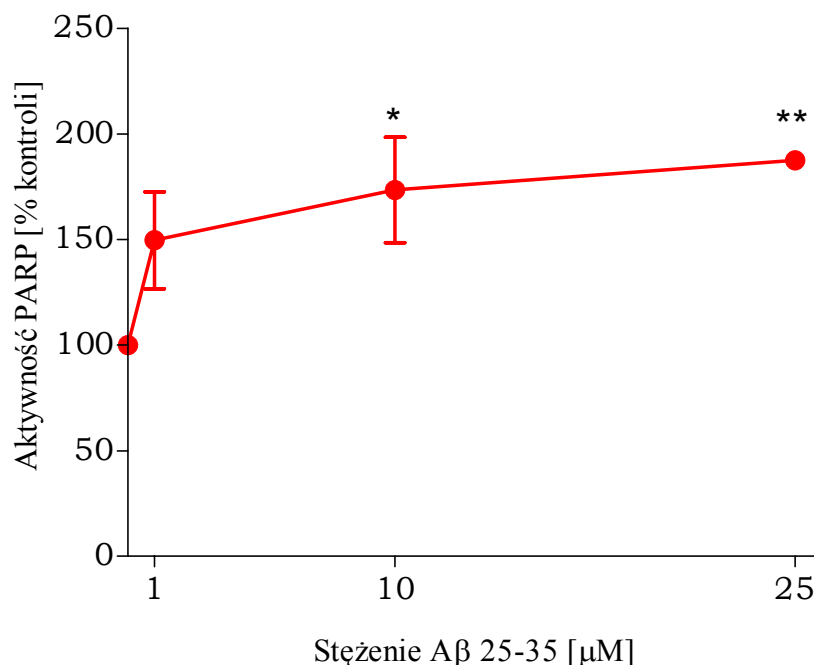


**Rycina 20. Efekt pobudzenia receptora muskarynowego oraz inhibicji receptora  $IP_3$  na aktywność polimerazy(poli-ADP)rybozy (PARP) w hipokampie u zwierząt dorosłych.**

Skrawki z hipokampa zwierząt dorosłych stabilizowano w buforze Krebs-Henseleit (pH 7,4) przez 30 minut w temperaturze 37°C w środowisku karbogenicznym (95% $O_2$ /5% $CO_2$ ). Następnie do wszystkich prób dodawano  $CaCl_2$  tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 2mM. oraz do jednej grupy skrawków TMB-8 w stężeniu 100 $\mu$ M. Inkubację z karbacholem i GTP( $\gamma$ )S w obecności TMB-8 w stężeniu 100 $\mu$ M lub bez TMB-8 kontynuowano przez 30 min. Po inkubacji skrawki homogenizowano i oznaczano aktywność PARP. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newman-Keuls, \* $p < 0,05$  w stosunku do aktywności PARP kontrolnej (skrawki inkubowane bez karbacholu i GTP( $\gamma$ )S), # $p < 0,05$  w stosunku do aktywności PARP oznaczanej w obecności karbacholu i GTP( $\gamma$ )S).



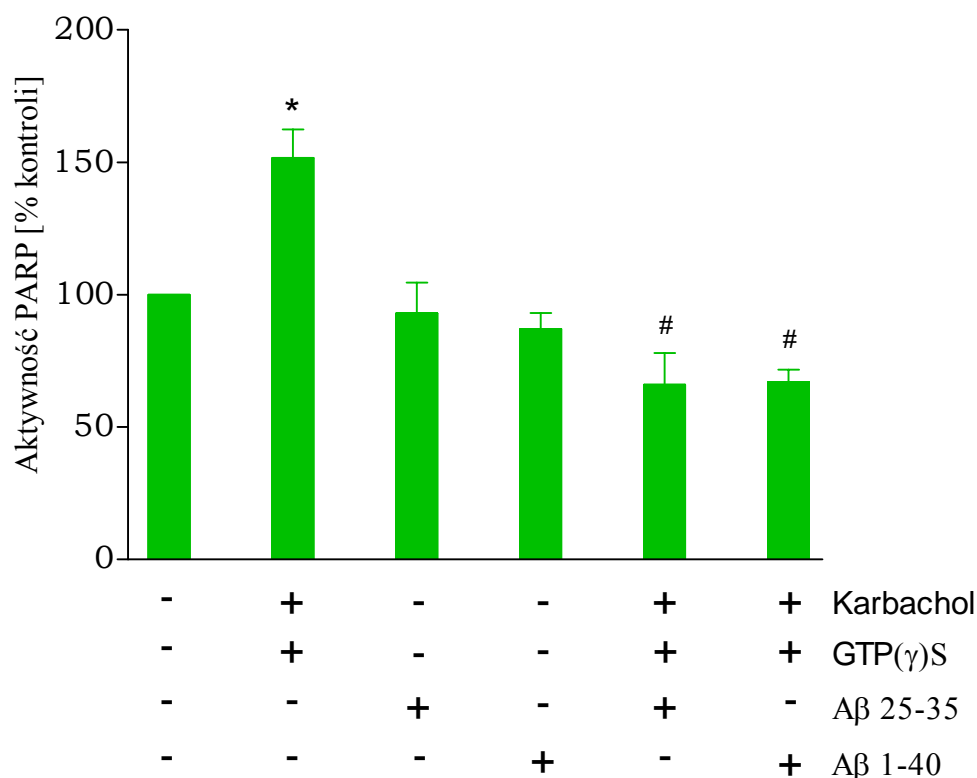
A $\beta$  25-35 w stężeniu 10-25 $\mu$ M stymuluje aktywność PARP wyłącznie w hipokampie (Rycina 21).



**Rycina 21. Zależna od stężenia peptydów A $\beta$  25-35 aktywność polimerazy(poli-ADP)rybozy (PARP) w hipokampie u zwierząt dorosłych.**

Skrawki z hipokampa zwierząt dorosłych stabilizowano w buforze Krebs-Henseleit (pH 7,4) przez 30 minut w temperaturze 37°C w środowisku karbogenu (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>). Następnie do wszystkich prób dodawano CaCl<sub>2</sub> tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 2mM i inkubację kontynuowano przez 30 min w obecności A $\beta$  25-35 w stężeniu 1-25 $\mu$ M. Po inkubacji skrawki homogenizowano i oznaczano aktywność PARP. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01 w stosunku do aktywności PARP kontrolnej (skrawki inkubowane bez A $\beta$ ).

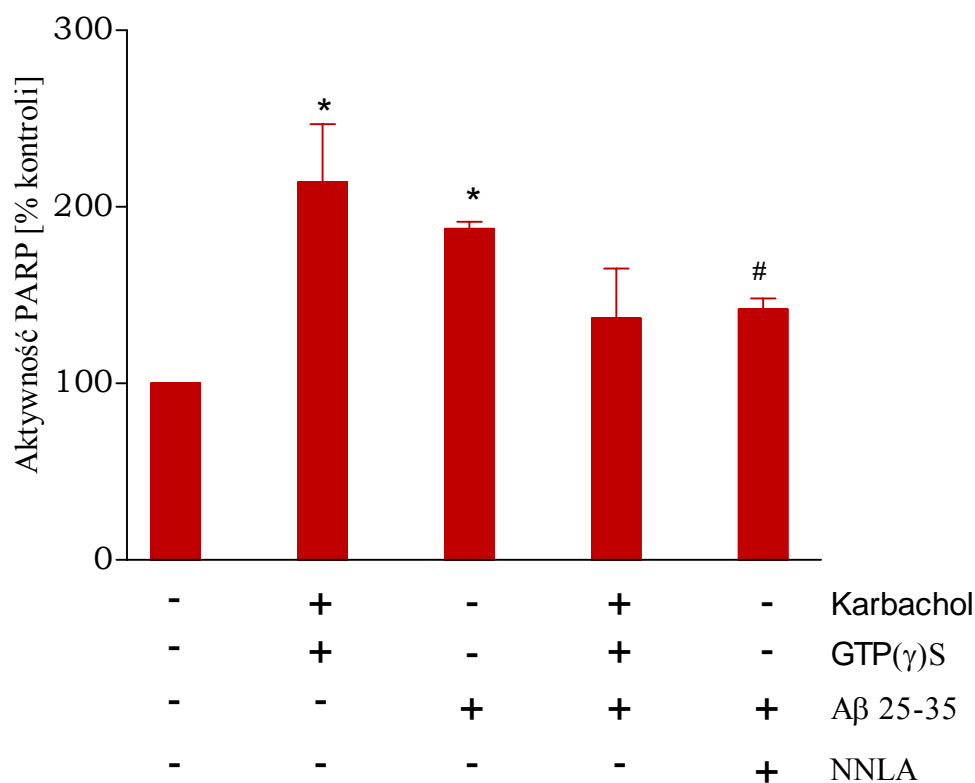
Peptydy amyloidu beta, A $\beta$  25-35 oraz długołańcuchowy A $\beta$  1-40 nie wpływają na aktywność PARP w korze mózgu. Jednakże oba peptydy likwidują stymulację PARP-u w tej strukturze mózgu wywołaną pobudzeniem układu cholinergicznego (Rycina 22).



**Rycina 22. Znaczenie pobudzenia receptora muskarynowego oraz peptydów Aβ w regulacji aktywności polimerazy(poli-ADP)rybozy (PARP) w korze mózgu u zwierząt dorosłych.**

Skawki z kory mózgu zwierząt dorosłych stabilizowano w buforze Krebs-Henseleit (pH 7,4) przez 30 minut w temperaturze 37°C w środowisku karbogenicznym (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>). Następnie do wszystkich prób dodawano CaCl<sub>2</sub> tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 2mM i inkubację kontynuowano przez 30 min w obecności peptydów Aβ w 25μM stężeniu lub z karbacholem w stężeniu 1mM i GTP(γ)S w stężeniu 100μM. Po inkubacji skawki homogenizowano i oznaczano aktywność PARP. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia ± SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \*p<0,05 w stosunku do aktywności PARP kontrolnej (skawki inkubowane bez Aβ i karbacholu i GTP(γ)S), #p<0,05 w stosunku do aktywności PARP oznaczanej w obecności karbacholu i GTP(γ)S).

W hipokampie A $\beta$  25-35 powoduje wzrost aktywności PARP-u, który utrzymuje się w obecności karbacholu i GTP( $\gamma$ )S i likwiduje aktywację enzymu zależną od pobudzenia receptora muskarynowego. Stymulacja PARP-u w hipokampie przez A $\beta$  jest obniżona w obecności NNLA, inhibitora syntazy tlenku azotu (**Rycina 23**).



**Rycina 23. Zmiany w aktywności polimerazy(poli-ADP)rybozy (PARP) w hipokampie u zwierząt dorosłych w wyniku pobudzenia receptora muskarynowego oraz A $\beta$  25-35.**

Skawki z hipokampa zwierząt dorosłych stabilizowano w buforze Krebs-Henseleit (pH 7,4) przez 30 minut w temperaturze 37°C w środowisku karbogenicznym (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>). Następnie do wszystkich prób dodawano CaCl<sub>2</sub> tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 2mM i inkubację kontynuowano przez 30 min w obecności badanych związków: A $\beta$  25-35 w 25 $\mu$ M stężeniu, karbacholu w stężeniu 1mM i GTP( $\gamma$ )S w stężeniu 100 $\mu$ M oraz 100 $\mu$ M NNLA. Po inkubacji skawki homogenizowano i oznaczano aktywność PARP. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \* $p$ <0,05 w stosunku do aktywności PARP kontrolnej (skawki inkubowane bez A $\beta$  i karbacholu i GTP( $\gamma$ )S), # $p$ <0,05 w stosunku do aktywności PARP oznaczanej w obecności A $\beta$ ).

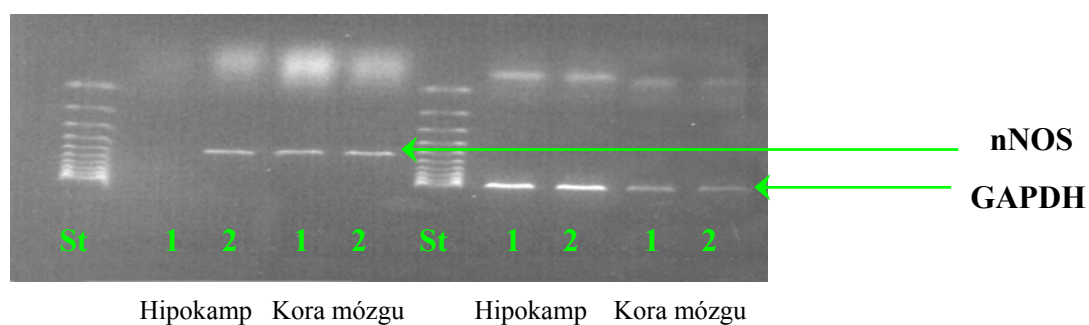
Uważa się, że PARP poprzez regulację czynników transkrypcyjnych wpływa na ekspresję białek. Ostatnie dane w literaturze wskazują na istotną rolę interakcji białka PARP z białkiem NFκB w regulacji tego czynnika transkrypcyjnego, który wpływa na ekspresję genu syntazy tlenu azotu (iNOS). Wyniki uzyskane w tej pracy wykazały, że w hipokampie u zwierząt starych, gdzie obniżona jest ilość białka PARP nie stwierdza się ekspresji genu dla iNOS (dane nie prezentowane), natomiast obserwuje się spadek ekspresji mRNA genu kodującego nNOS w stosunku do ekspresji tego genu u zwierząt dorosłych (Tabela VII).

**Tabela VII. Ekspresja mRNA genu kodującego białko nNOS w korze mózgu i hipokampie u zwierząt dorosłych i starych.**

nNOS/GAPDH (% kontroli)		
	Dorosłe	Stare
<b>Kora mózgu</b>	0,975 ± 0,088 (100)	0,733 ± 0,148 (75)
<b>Hipokamp</b>	0,705 ± 0,172 (100)	0,119 ± 0,095 (17) (*)

Prezentowane dane wyrażają stosunek intensywności produktu reakcji RT-PCR badanego białka do genu białka GAPDH. Wyniki przedstawiają wartości z czterech niezależnych doświadczeń. Znamienność oznaczono przy użyciu metody ANOVA i testu Newmana-Keuls, \* $p < 0,05$  w stosunku do zwierząt dorosłych (kontrola).

**Zdjęcie reprezentatywne pomiaru ekspresji mRNA genu kodującego białko nNOS w korze mózgu i hipokampie u zwierząt dorosłych i starych.**



1 – Stary; 2 – Dorosły; St - Standard

### **V.3    Udział A $\beta$ w modulacji PI-PLC w mózгах dojrzalych i starczych.**

Celem podjętych doświadczeń było zbadanie wpływu peptydów A $\beta$  na aktywność fosfolipazy C degradującej fosfatydyloinozytol (PI-PLC) we frakcjach subkomórkowych z różnych części mózgu dojrzalego i starczego. Ponadto zbadano wpływ peptydów A $\beta$  oraz apolipoproteiny E4 na aktywność i poziom białka wybranych izoform PLC.

#### **V.3.1    Efekt A $\beta$ oraz związków towarzyszących na PI-PLC w błonach synaptoplazmatycznych oraz cytozolu z mózгów dojrzalych i starczych.**

Celem podjętych doświadczeń było zbadanie udziału peptydów A $\beta$  oraz związków jemu towarzyszących na degradację fosfatydyloinozytolu (PI) przez fosfolipazę C (PI-PLC). Aktywność PI-PLC oznaczano w obecności jonów litu przy użyciu egzogenego substratu fosfatydylo[ $^3$ H]inozytolu (PI) poprzez pomiar poziomu radioaktywności powstałego inozytolofosforanu (IP $_1$ ). Ponadto zbadano wpływ A $\beta$  na poziom radioaktywności drugiego produktu PLC, diacyloglicerolu. Badania prowadzono na frakcji błon synaptoplazmatycznych (SPM) oraz frakcji cytozolowej z kory mózgu, prążkowie i hipokampa. Stwierdzono, że enzym ten wykazuje zbliżoną aktywność specyficzną we wszystkich badanych częściach mózgu dojrzalego i starczego. W błonach synaptoplazmatycznych z hipokampa i prążkowie aktywność PI-PLC jest niższa u zwierząt starych w porównaniu do dorosłych, ale różnica ta jest nieznamienne statystycznie (**Tabela VIII**).

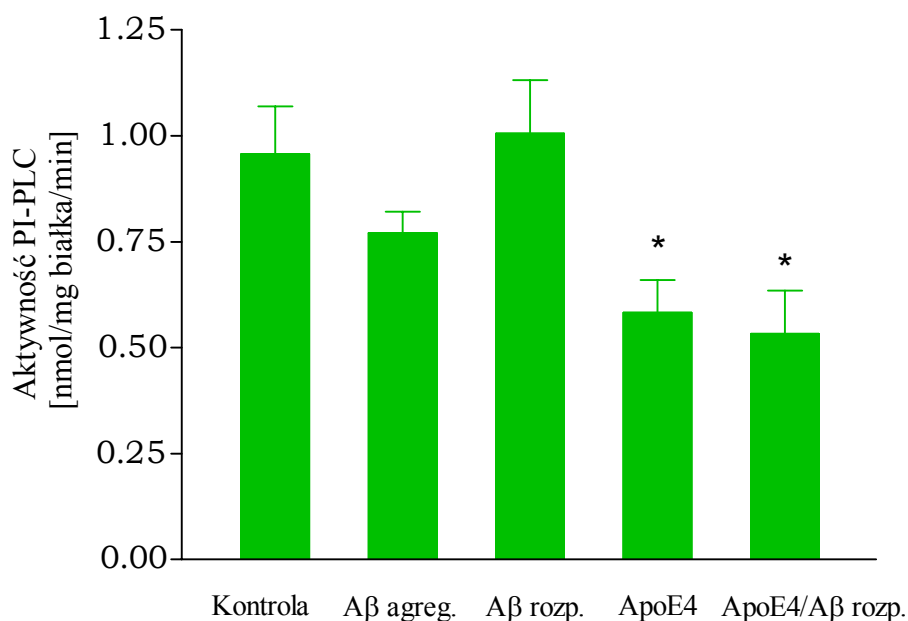
**Tabela VIII. Aktywność PI-PLC w korze mózgu, hipokampie i w prążkowie w mózgach dojrzałych i starczych.**

Aktywność PI-PLC [nmol/mg białka/min]			
Część mózgu		Dorosłe	Stare
Kora mózgu	-	0,767 ± 0,074	0,760 ± 0,072
	CaCl <sub>2</sub> (2mM)	1,339 ± 0,103 (*)	1,195 ± 0,113 (*)
Hipokamp	-	0,624 ± 0,035	0,534 ± 0,037
	CaCl <sub>2</sub> (2mM)	1,436 ± 0,041 (*)	1,291 ± 0,051 (*)
Prążkowie	-	0,726 ± 0,066	0,572 ± 0,056
	CaCl <sub>2</sub> (2mM)	1,227 ± 0,118 (*)	1,043 ± 0,098 (*)

Z kory mózgu, hipokampa i prążkowie zwierząt dorosłych i starych izolowano błony synaptoplazmatyczne i oznaczano aktywność PI-PLC w obecności endogennego i 2mM stężenia CaCl<sub>2</sub>. Wyniki przedstawiają wartości z trzech niezależnych doświadczeń. Znamienność badano przy użyciu metody ANOVA i testu Newmana-Keulsa, \* $p < 0,05$  w stosunku do aktywności PI-PLC w endogennym stężeniu CaCl<sub>2</sub>.

Aβ 25-35 w formie rozpuszczalnej niezależnie od stężenia (1-50μM) nie wpływa na aktywność PI-PLC (dane nie prezentowane).

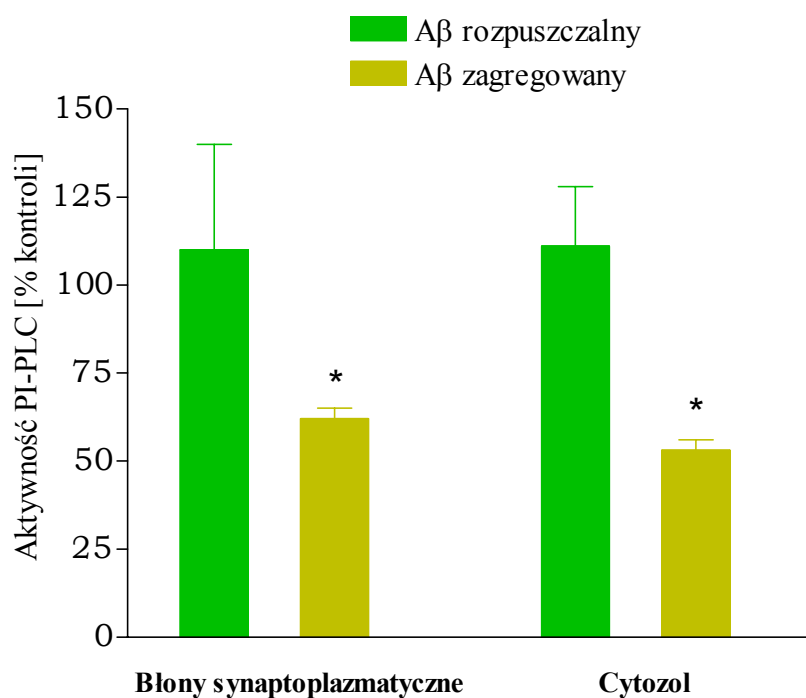
Poddany agregacji Aβ 25-35 również pozostaje bez wpływu na enzym, natomiast apolipoproteina E4 w stężeniu 0,25μM obniża aktywność enzymu o około 40% w błonach synaptoplazmatycznych. Obecność rozpuszczalnej formy Aβ 25-35 w stężeniu 25μM (stosunek molowy apoE4/Aβ, 1/100) nie wpływa na stopień inhibicji PI-PLC (Rycina 24).



**Rycina 24. Działanie peptydów A $\beta$  25-35 oraz apoE4 na aktywność PI-PLC w błonach synaptoplazmatycznych z kory mózgu u zwierząt dorosłych.**

Aktywność PI-PLC oznaczano w obecności A $\beta$  25-35 w 25  $\mu$ M stężeniu, apoE4 w stężeniu 0,25  $\mu$ M lub w obecności apoE4/A $\beta$  w stosunku molowym 1:100. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newman-Keulsa, \* $p$ <0,05 w stosunku do kontroli.

A $\beta$  1-40 rozpuszczalny pozostaje również bez wpływu na enzym we frakcji błonowej i cytozolowej. Peptyd ten w formie zagregowanej obniża aktywność PI-PLC we frakcji błonowej o 38%, a w cytozolu o 47% (**Rycina 25**).

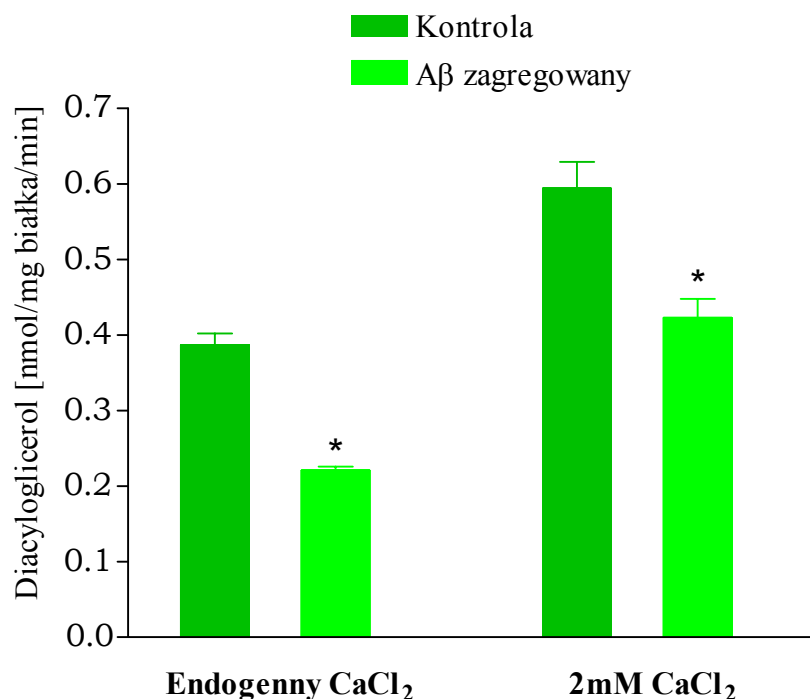


**Rycina 25. Udział peptydów A $\beta$  1-40 w modulacji aktywności PI-PLC w błonach synaptoplazmatycznych oraz w cytozolu z kory mózgu zwierząt dorosłych.**

Błony synaptoplazmatyczne oraz frakcję cytozolową z kory mózgowej inkubowano w obecności zagregowanej lub rozpuszczalnej formy A $\beta$  1-40 w 25  $\mu$ M stężeniu oraz bez A $\beta$  (kontrola) i oznaczano aktywność PI-PLC. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli.



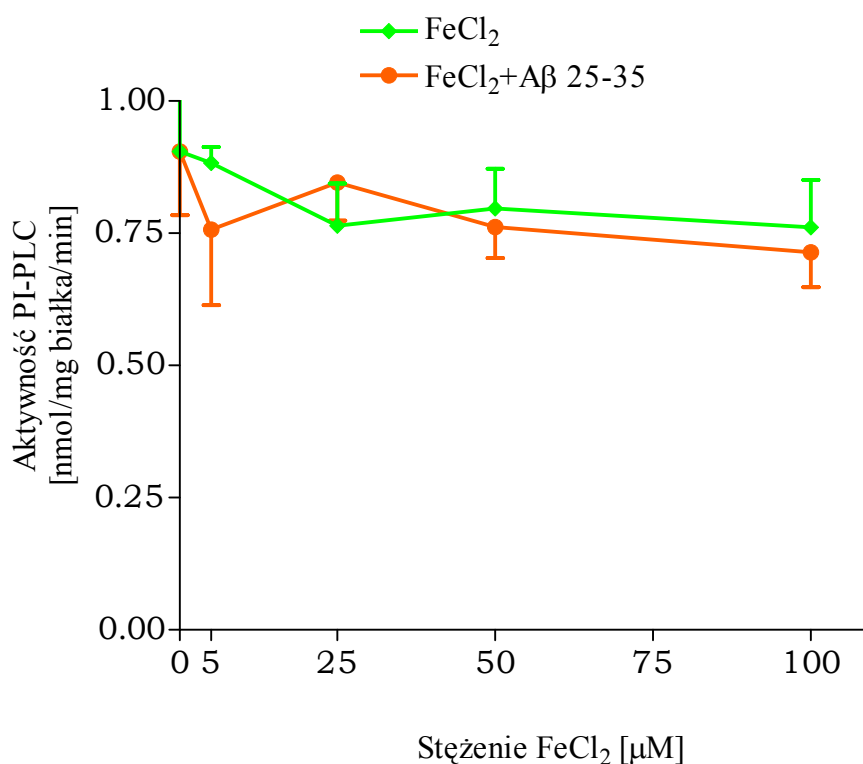
Zagregowany A $\beta$  1-40 powoduje 43% obniżenie poziomu radioaktywności DAG w błonach synaptoplazmatycznych w obecności endogennego wapnia oraz 30% w obecności 2mM CaCl<sub>2</sub> w porównaniu do kontroli. Sugeruje to, że A $\beta$  może brać udział w modulacji enzymów metabolizujących diacyloglicerol, DAG-kinazy i DAG-lipazy (Rycina 26).



**Rycina 26. Zmiany poziomu radioaktywnego diacyloglicerolu w błonach synaptoplazmatycznych z kory mózgu zwierząt dorosłych w wyniku działania zagregowanego A $\beta$  1-40.**

Z kory mózgowej zwierząt dorosłych izolowano błony synaptoplazmatyczne i inkubowano w obecności A $\beta$  1-40 w stężeniu 25 $\mu$ M lub bez A $\beta$  (kontrola). Następnie oznaczano radioaktywność diacyloglicerolu. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newman-Keulsa, \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli.

W celu lepszego zrozumienia mechanizmu inhibicji PLC przez peptydy A $\beta$  oraz mając na uwadze dane dotyczące istotnego udziału jonów żelaza w toksyczności A $\beta$  zbadano wpływ różnych stężeń FeCl<sub>2</sub> na aktywność PI-PLC. Wyniki wskazują, że FeCl<sub>2</sub> nie wpływa na aktywność tego enzymu niezależnie od obecności A $\beta$  25-35 (**Rycina 27**). Natomiast jony żelaza aktywują znamienne zależną od rodnika hydroksylogowego oksydację lipidów i białek (**Tabela III**), co wskazuje na dużą oporność PI-PLC na działanie wolnych rodników.

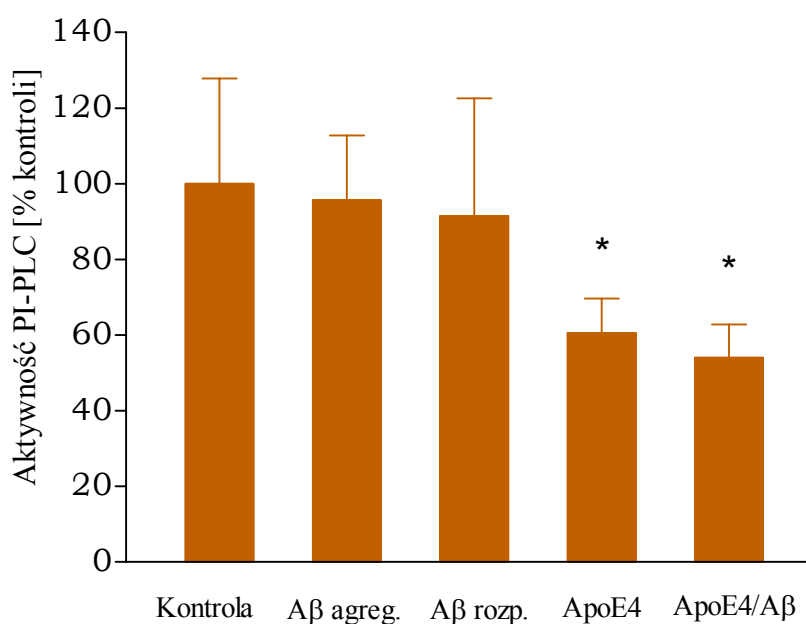


**Rycina 27. Aktywność PI-PLC w błonach synaptoplazmatycznych kory mózgu u zwierząt dorosłych w obecności FeCl<sub>2</sub> i A $\beta$  25-35.**

Aktywność PI-PLC oznaczano w obecności A $\beta$  25-35 lub FeCl<sub>2</sub> lub obydwu czynników razem. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność badano metodą ANOVA

### V.3.2 Aktywność i poziom białka PLC w hipokampie w wyniku działania A $\beta$ i apoE4.

W kolejnych doświadczeniach zbadano wpływ peptydów A $\beta$  oraz apoE4 na poziom białka i aktywność PLC w hipokampie z uwzględnieniem dłuższego czasu inkubacji. Badania te miały na celu stwierdzenie czy związki te mogą wywoływać zmiany w ekspresji genu dla wybranych izoform PLC oraz spowodować obniżenie aktywności PLC w hipokampie. Skrawki z hipokampa inkubowano przez 6 godzin w temperaturze 37°C w atmosferze karbogenu w buforze Krebsa-Ringera w obecności 0,5 $\mu$ M apoE4, 50 $\mu$ M A $\beta$  25-35 lub w obecności obydwu związków razem. Następnie skrawki homogenizowano i oznaczano aktywność enzymu oraz poziom białka poszczególnych izoform PLC. Stwierdzono, że w hipokampie podobnie jak w błonach synaptoplazmatycznych z kory mózgu wyłącznie apoE4 obniża aktywność PI-PLC o około 40%. A $\beta$  25-35 zarówno w formie rozpuszczalnej jak i poddany agregacji pozostaje bez wpływu na aktywność PI-PLC również w obecności apoE4 (**Rycina 28**).



**Rycina 28. Modulacja aktywności PI-PLC w hipokampie u zwierząt dorosłych przez peptydy Aβ 25-35 oraz apoE4.**

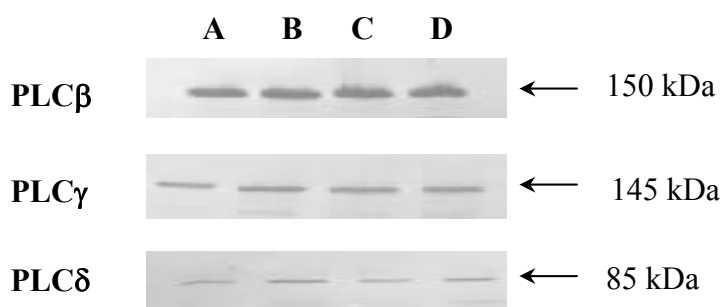
Skrawki z hipokampa zwierząt dorosłych stabilizowano w buforze Krebs-Henseleit (pH 7,4) przez 30 minut w temperaturze 37°C w środowisku karbogenicznym (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>). Następnie do wszystkich prób dodawano CaCl<sub>2</sub> tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 2mM i inkubację kontynuowano przez 6 godzin w obecności Aβ 25-35 w 50μM stężeniu lub z apoE4 w stężeniu 0,5μM lub w obecności apoE4/Aβ w stosunku molowym 1:100. Po inkubacji skrawki homogenizowano i oznaczano aktywność PI-PLC. Przedstawione dane są wartościami z trzech do pięciu niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia ± SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \*p<0,05 w stosunku do kontroli.

Udział peptydów Aβ oraz apoE4 w regulacji poziomu białka izoform PLC badano metodą immunochemiczną (Western blot) z użyciem specyficznych przeciwciał przeciwko izoformie PLCβ, PLCγ i PLCδ (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Zaobserwowano, że apoE4 powoduje wzrost poziomu białka izoformy PLCδ, w stosunku do kontroli o 25% i pozostaje bez wpływu na pozostałe izoformy, natomiast Aβ 25-35 nie wpływa na poziom białka PLC żadnej badanej izoformy (**Tabela IX**).

Tabela IX. *Udział peptydów A $\beta$  25-35 oraz apoE4 w regulacji poziomu białka fosfolipazy C w hipokampie.*

Immunoreaktywność PLC [gęstość optyczna]				
Izofорма PLC	Kontrola (A)	A $\beta$ agregowany (B)	A $\beta$ rozpuszczalny (C)	ApoE4 (D)
PLC $\beta$	3300 $\pm$ 580	3362 $\pm$ 545	3049 $\pm$ 356	2967 $\pm$ 947
PLC $\gamma$	1717 $\pm$ 310	1779 $\pm$ 181	1789 $\pm$ 268	1590 $\pm$ 248
PLC $\delta$	457 $\pm$ 33	402 $\pm$ 89	395 $\pm$ 161	681 $\pm$ 143 (*)

*Zdjęcie reprezentatywne Western blotu z wybranego doświadczenia*



A - Kontrola; B - A $\beta$  25-35 agregowany; C - A $\beta$  25-35 rozpuszczalny; D - ApoE4

Skrawki z hipokampa zwierząt dorosłych stabilizowano w buforze Krebs-Henseleit (pH 7,4) przez 30 minut w temperaturze 37°C w środowisku karbogenicznym (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>). Następnie do wszystkich prób dodawano CaCl<sub>2</sub> tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 2mM i inkubację kontynuowano przez 6 godzin w obecności A $\beta$  25-35 w 50 $\mu$ M stężeniu lub z apoE4 w stężeniu 0,5 $\mu$ M lub w obecności apoE4/A $\beta$  w stosunku molowym 1:100. Po zawiesinę skrawków mieszano z buforem do próbek w stosunku objętościowym 1:1, inkubowano 5 min. w temp. 95°C i poddawano elektrofrezie na żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE. Rozdzielone białka przenoszono na błonę nitrocelulozową Hybond-Extra C (Amersham) i blokowano 1 godz. w temp. pokojowej w buforze PBS-T z 5% odtłuszczonym mlekiem. Kolejno inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem monoklonalnym przeciwko PLC $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  (santa Cruz Biotechnology, Inc.) w rozcieńczeniu 1:500 i po trzykrotnym płukaniu w buforze PBS-T inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem typu IgG sprzężonym z peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:8000. Intensywność prążków oceniano densytometrycznie. Dane w tabeli są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń (średnia  $\pm$  SD).

#### V.4 Charakterystyka działania A $\beta$ na aktywność kinaz fosfoinozytydów i poziom białek transportujących fosfatydyloinozytol.

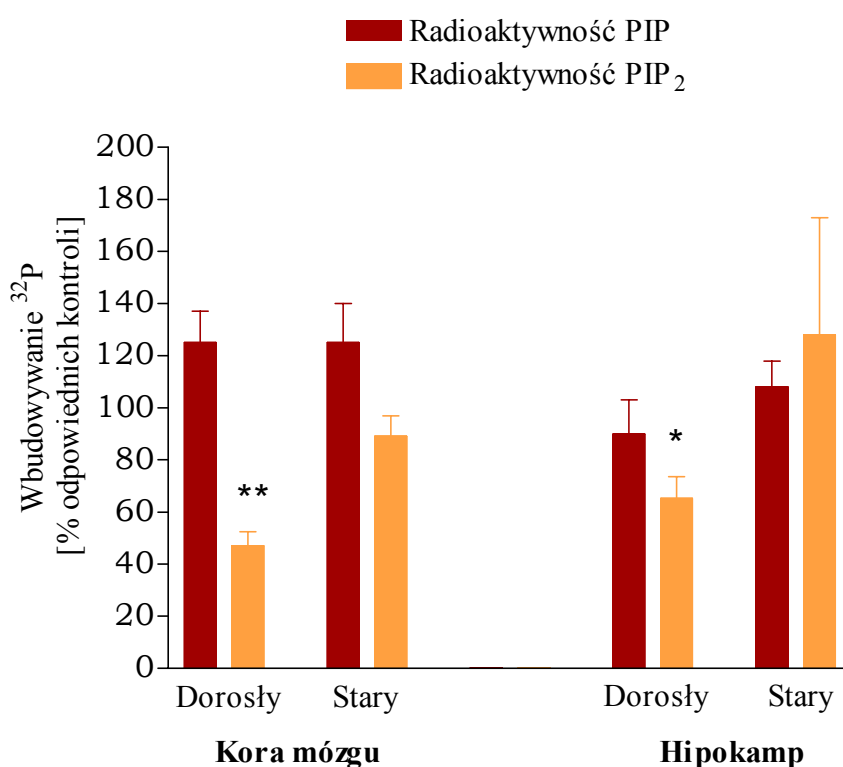
Celem podjętych doświadczeń było zbadanie udziału peptydów A $\beta$  oraz apoE4 w regulacji aktywności kinaz fosfolipidów inozytolowych: PI-4kinazy i PIP-5kinazy, odpowiedzialnych za syntezę polifosfoinozytydów: PI(4)P i PI(4,5)P<sub>2</sub>. Zbadano wpływ A $\beta$  na fosforylację endogennych fosfolipidów inozytolowych oraz na poziom białek transportujących fosfatydyloinozytol (PI-TP). Do badań używano błon synaptoplazmatycznych z kory mózgu i hipokampa zwierząt dorosłych i starych. W korze mózgu i w hipokampie u zwierząt starych zaobserwowano odpowiednio 40% i 52% obniżenie fosforylacji endogennego fosfatydyloinozytolo-4-fosforanu (PIP) do fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP<sub>2</sub>) oraz 52% obniżenie w hipokampie w porównaniu do zwierząt dorosłych. (Tabela X).

**Tabela X.** Wbudowywanie [<sup>32</sup>P] z [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP do fosfatydyloinozytoli (PI) oraz fosfatydyloinozytolo-4-monofosforanu (PIP) błon synaptoplazmatycznych z dojrzałej i starczej kory mózgowej i hipokampa.

Fosforylacja PI i PIP [pmol/mg białka/min]				
	Radioaktywność PI(4)P		Radioaktywność PI(4,5)P <sub>2</sub>	
	Mózg dojrzały	Mózg starczy	Mózg dojrzały	Mózg starczy
<b>Kora mózgu</b>	70,37 ± 8,59	59,32 ± 8,43	75,19 ± 8,41	45,86 ± 7,44 (*)
<b>Hipokamp</b>	61,89 ± 6,04	56,56 ± 5,33	50,95 ± 5,43	24,67 ± 3,12 (**)

Z kory mózgu i z hipokampa zwierząt dorosłych i starych izolowano błony synaptoplazmatyczne i oznaczano fosforylację PI do PI(4)P oraz PIP do PI(4,5)P<sub>2</sub> przy użyciu radioaktywnego [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Przedstawione dane są wartościami z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia ± SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  w stosunku do kontroli.

Długołańcuchowy A $\beta$  1-42 wywołuje około 50% inhibicję fosforylacji PIP do PIP<sub>2</sub> w korze mózgu i hipokampie zwierząt dorosłych, nie wpływa na ten proces w mózgzach starych (**Rycina 29**). Neurotoksyczny fragment A $\beta$  25-35 niezależnie od stopnia agregacji również obniża fosforylację endogennych fosfolipidów inozytolowych o około 20% w korze mózgu zwierząt dorosłych (dane nie przedstawione).

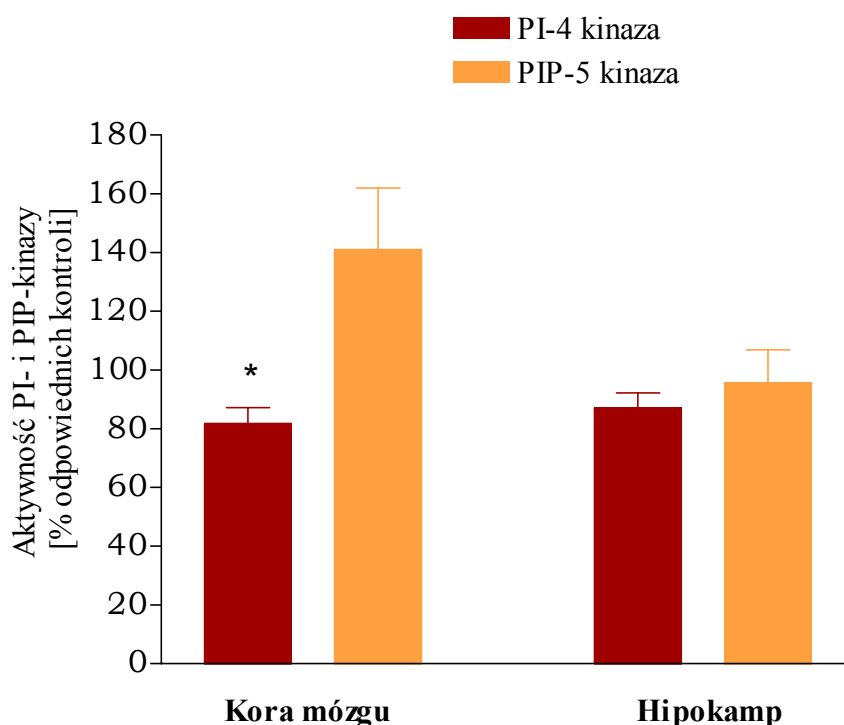


**Rycina 29. Efekt zagregowanego A $\beta$  1-42 na wbudowywanie [ $^{32}$ P] z [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP do fosfatydyloinozytolu (PI) oraz fosfatydyloinozytolo-4-monofosforanu (PIP) błon synaptoplazmatycznych z dojrzałej i starczej kory mózgowej i hipokampa.**

Z kory mózgu i hipokampa zwierząt dorosłych i starych izolowano błony synaptoplazmatyczne i inkubowano 30 min w 30 °C w obecności A $\beta$  1-42 w 25  $\mu$ M stężeniu lub bez A $\beta$  (kontrola). Następnie oznaczano radioaktywność PIP i PIP<sub>2</sub> (fosforylację PI do PI(4)P i PIP do PI(4,5)P<sub>2</sub>). Przedstawione dane są wartościami z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01 w stosunku do kontroli.

Zbadano również wpływ A $\beta$  1-42 na aktywność PI-4kinazy i PIP-5kinazy w optymalnych warunkach, w obecności egzogennych substratów: fosfatydyloinozytolu (PI) i fosfatydyloinozytolo-4-monofosforanu (PI(4)P) w mózgzach dojrzałych i starych. Stwierdzono, że proces starzenia nie wpływa na aktywność PI-4kinazy i

PIP-5kinazy (dane nie przedstawione). Wobec powyższego prezentowana wcześniej obniżona fosforylacja PIP do PIP<sub>2</sub> w mózгах starczych spowodowana jest obniżeniem poziomu lub dostępności endogennego PIP u zwierząt starych. A $\beta$  1-42 w stężeniu 25 $\mu$ M obniża aktywność PI-4kinazy w korze mózgu u zwierząt dorosłych o około 20%, nie wpływa natomiast na aktywność PIP-5kinazy (**Rycina 30**). W mózгах starczych peptyd ten nie modulował aktywności kinaz fosfoinozytydów (dane nie przedstawione).

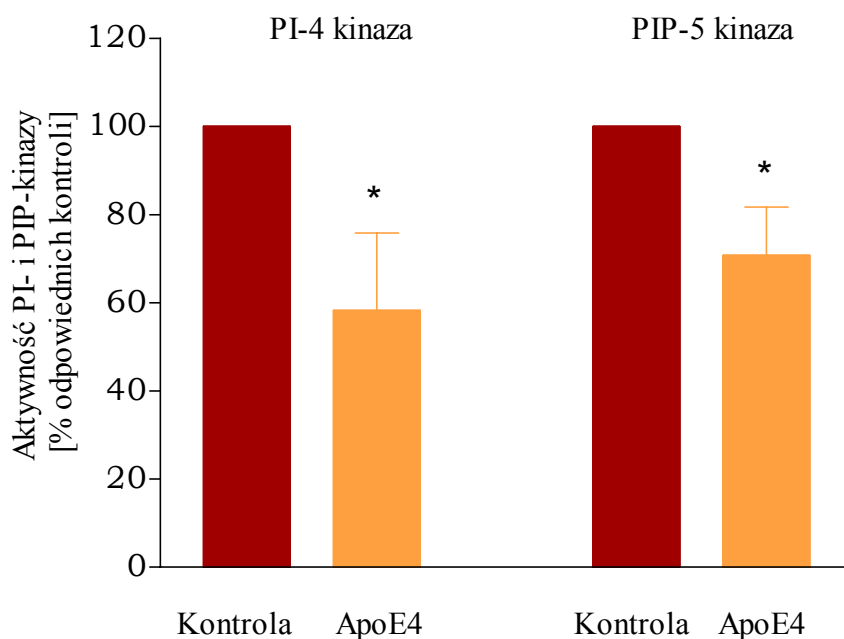


**Rycina 30. Aktywność PI-4kinazy i PIP-5kinazy w błonach synaptoplazmatycznych kory mózgu i hipokampa zwierząt dorosłych pod wpływem działania zagregowanego A $\beta$  1-42.**

Z kory mózgu i hipokampa zwierząt dorosłych i starych izolowano błony synaptoplazmatyczne i inkubowano 30 min w 30 °C w obecności A $\beta$  1-42 w 25 $\mu$ M stężeniu lub bez A $\beta$  (kontrola). Następnie oznaczano aktywność PI-4kinazy i PIP-5kinazy z użyciem egzogennych substratów. Przedstawione dane są wartościami z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newman-Keulsa, \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli.

ApoE4 w stężeniu 0,25 $\mu$ M powoduje inhibicję PI-4kinazy oraz PIP-5kinazy w korze mózgu u zwierząt dorosłych odpowiednio o około 40% i 30% (**Rycina 31**).

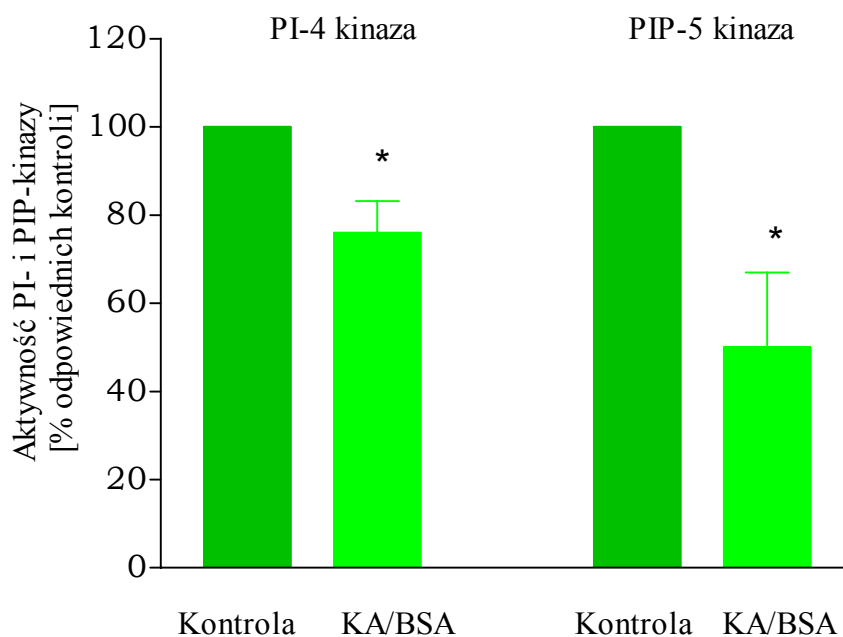




**Rycina 31. Modulacja aktywności kinaz fosfolipidów inozytolowych w błonach synaptoplazmatycznych z kory mózgu zwierząt dorosłych przez apoE4.**

Z kory mózgu zwierząt dorosłych izolowano błony synaptoplazmatyczne i inkubowano 30 min w 30 °C w obecności apoE4 w 0,25 μM stężeniu lub bez apoE4 (kontrola). Następnie oznaczano aktywność PI-4kinazy i PIP-5kinazy z użyciem egzogennych substratów. Przedstawione dane są wartościami z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia ± SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli.

Kwas arachidonowy w stężeniu 150 μM w obecności 15 μM albuminy (BSA) wywołuje 24% obniżenie aktywności PI-4kinazy oraz 50% inhibicję PIP-5kinazy (**Rycina 32**).



**Rycina 32. Udział KA w regulacji aktywności PI-4kinazy i PIP-5kinazy w błonach synaptoplazmatycznych kory mózgu zwierząt dorosłych.**

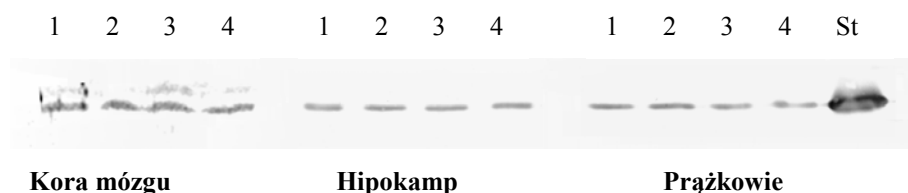
Z kory mózgu zwierząt dorosłych izolowano błony synaptoplazmatyczne i inkubowano 30 min w 30 °C w obecności KA w 150 μM stężeniu i 15 μM BSA lub bez KA (kontrola). Następnie oznaczano aktywność PI-4kinazy i PIP-5kinazy z użyciem egzogennych substratów. Przedstawione dane są wartościami z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia ± SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli.

Fosfatydyloinozytol, substrat dla kinaz transportowany jest z miejsca syntezy do błon synaptoplazmatycznych przez białka transportujące (PI-TP). Powstało pytanie czy obniżenie poziomu substratu dla kinaz może wynikać z zaburzenia funkcji białek PI-TP. Izoforma PI-TP $\alpha$  stanowi 80% białek transportujących fosfatydyloinozytol. Zaobserwowano, że agregowany A $\beta$  25-35 nie wywiera wpływu na poziom białek PI-TP $\alpha$  w korze mózgu, hipokampie i prądkowiu u zwierząt dorosłych i starych. Białka te nie ulegają zaburzeniu w badanych częściach mózgu w proces starzenia (**Tabela XI**).

**Tabela XI. Modyfikacja poziomu białek transportujących PI-TP $\alpha$  w wyniku działania agregowanego A $\beta$  25-35 w korze mózgu, hipokampie i prążkowie u zwierząt dorosłych i starych.**

Poziom PI-TP $\alpha$ [ng PI-TP $\alpha$ /25 $\mu$ g białka]			
Część mózgu		Dorosłe	Stare
Kora mózgu	-	9,028 $\pm$ 2,323	8,720 $\pm$ 0,523
	A $\beta$	11,225 $\pm$ 3,359	11,690 $\pm$ 3,550
Hipokamp	-	3,127 $\pm$ 0,258	2,698 $\pm$ 0,035
	A $\beta$	3,088 $\pm$ 0,436	2,995 $\pm$ 0,112
Prążkowie	-	1,882 $\pm$ 0,083	2,379 $\pm$ 0,217
	A $\beta$	2,246 $\pm$ 0,075	2,461 $\pm$ 0,029

**Zdjęcie reprezentatywne Western blotu z jednego wybranego doświadczenia**



1 – Skrawki z mózgu dojrzałego inkubowane bez A $\beta$ ; 2 – Skrawki z mózgu dojrzałego inkubowane z A $\beta$ ; 3 – Skrawki z mózgu starczego inkubowane bez A $\beta$ ; 4 – Skrawki z mózgu starczego inkubowane z A $\beta$ ; St – Standard PI-TP $\alpha$ .

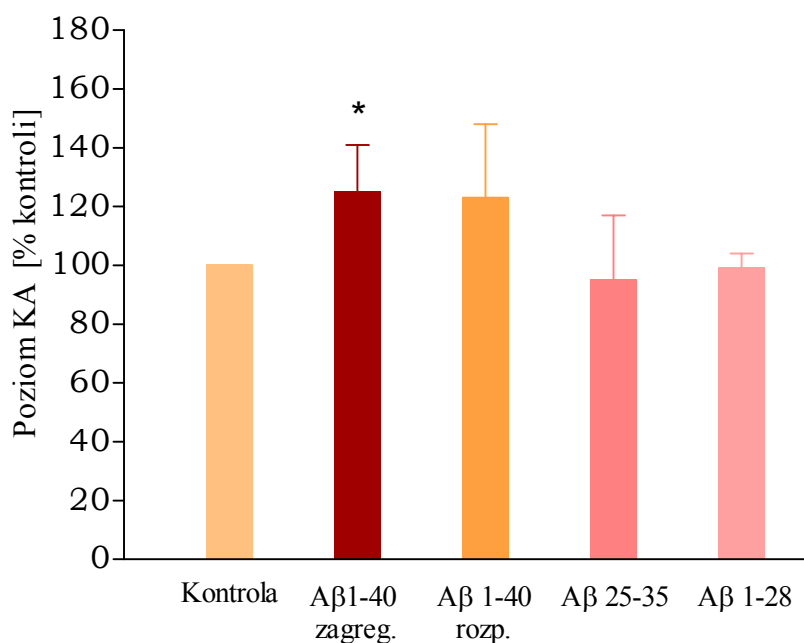
Z kory mózgu, hipokampa i prążkowie zwierząt dorosłych i starych izolowano skrawki, zawieszano w buforze Krebs-Henseleit i inkubowano przez 6 godzin w inkubatorze do hodowli komórkowej w temperaturze 37°C w środowisku karbogenu (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>) w obecności A $\beta$  25-35 w 25 $\mu$ M stężeniu lub bez A $\beta$  (kontrola). Następnie zawiesinę skrawków mieszano z buforem do próbek w stosunku objętościowym 1:1, inkubowano 5 min. w temp. 95 °C i poddawano elektroforezie na żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE. Rozdzielone białka przenoszono na błonę nitrocelulozową Hybond-Extra C (Amersham) i blokowano 1 godz. w temp. pokojowej w buforze PBS-T z 5% odtłuszczonym mlekiem. Kolejno inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem monoklonalnym przeciwko PI-TP $\alpha$  (Affiniti, Wielka Brytania) w rozcieńczeniu 1:200 i po trzykrotnym płukaniu w buforze PBS-T inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem typu IgG sprzężonym z alkaliczną fosfatazą w rozcieńczeniu 1:1000. Intensywność prążków oceniano densytometrycznie. Dane w tabeli są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń (średnia  $\pm$  SD). Znamienność badano metodą ANOVA.

## V.5 Aktywacja procesów wolnorodnikowych i cytozolowego czynnika proapoptotycznego w synaptozomach przez $A\beta$ .

Podjęte doświadczenia miały na celu wyjaśnienie, czy peptydy  $A\beta$  biorą udział w stymulacji uwalniania kwasu arachidonowego i procesów wolnorodnikowych oraz w aktywacji napływu jonów wapnia i cytozolowego czynnika (proapoptotycznego) w zakończeniach synaptycznych, który prowadzi do degradacji jądrowego DNA i PARP-u.

### V.5.1 Udział $A\beta$ w uwalnianiu KA i aktywacji procesów wolnorodnikowych w synaptozomach z mózgu szczura dorosłego.

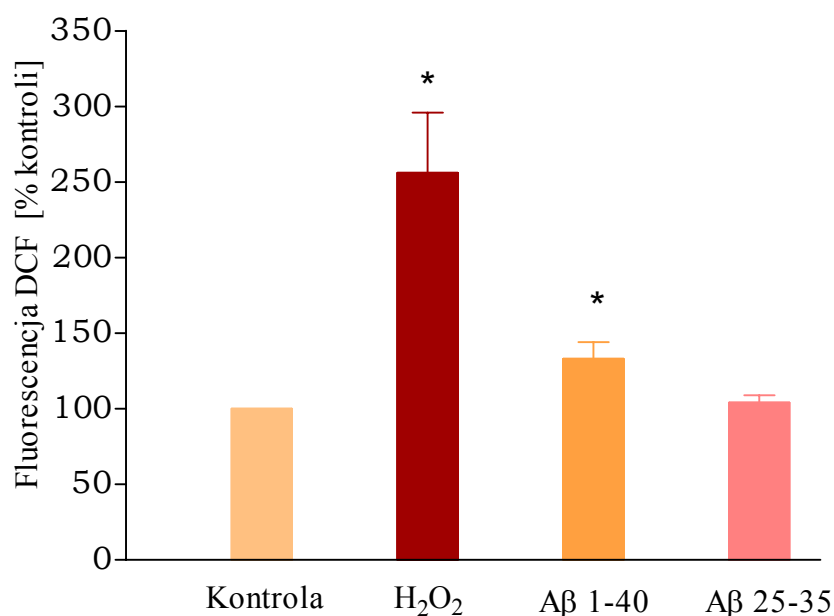
Badania wykazały, że wyłącznie zagregowany  $A\beta$  1-40 stymuluje uwalnianie KA z fosfatydyloinozytolu błon synaptoplazmatycznych,  $A\beta$  25-35 oraz  $A\beta$  1-28 nie wpływały na ten proces (**Rycina 33**).



**Rycina 33. Działanie peptydów  $A\beta$  na uwalnianie KA z fosfatydyloinozytolu błon synaptoplazmatycznych z kory mózgu zwierząt dorosłych.**

Z kory mózgu zwierząt dorosłych izolowano błony synaptoplazmatyczne i używano do oznaczania uwalnianie KA w obecności egzogenego [ $^{14}$ C-KA]PI. Inkubację przeprowadzano z peptydami A $\beta$  w 25  $\mu$ M stężeniu lub bez A $\beta$  (kontrola). Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD). Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa, \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli.

Poziom wolnych rodników w synaptozomach badano poprzez pomiar utleniania sondy dichlorofluoresceiny (DCF-DA). Stwierdzono, że zagregowany A $\beta$  1-40 w 25  $\mu$ M stężeniu oraz 250  $\mu$ M H $_2$ O $_2$  stymulują produkcję wolnych rodników w synaptozomach z kory mózgu po 4 godzinach inkubacji. W obecności agregowanego A $\beta$  25-35 w 25  $\mu$ M stężeniu nie stwierdzono wzrostu poziomu wolnych rodników (**Rycina 34**).

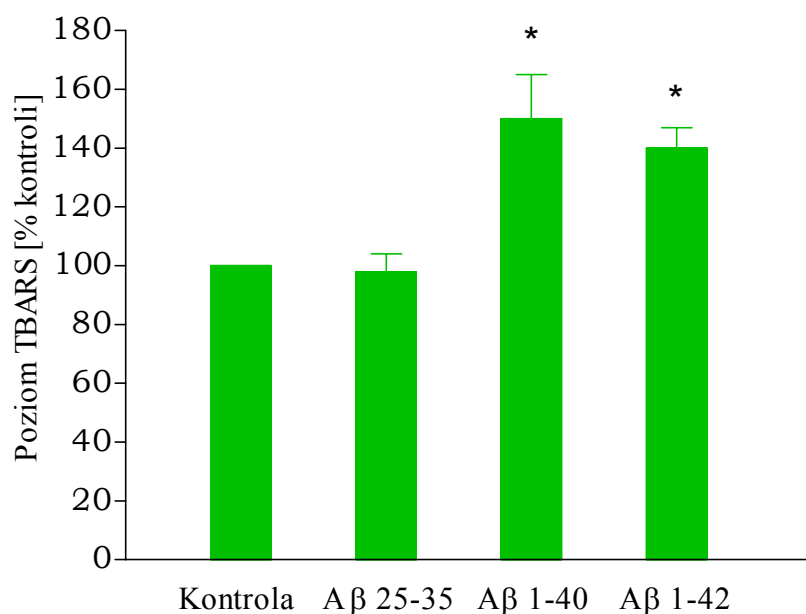


**Rycina 34. Poziom wolnych rodników w synaptozomach pod wpływem działania peptydów A $\beta$**

Z kory mózgu z hipokampami zwierząt dorosłych przygotowywano synaptozomy. Świeżo wyizolowane synaptozomy były inkubowane w obecności 15  $\mu$ M H $_2$ DCF-DA w buforze Locke'a przez 30 min. w 37  $^{\circ}$ C w ciemności. Następnie synaptozomy inkubowano w środowisku karbogenu (95%O $_2$ /5%CO $_2$ ) przez 4 godziny w 37  $^{\circ}$ C z H $_2$ O $_2$  w 250  $\mu$ M stężeniu i z peptydami A $\beta$  w 25  $\mu$ M stężeniu lub bez A $\beta$  i H $_2$ O $_2$  (kontrola). Fluorescencję DCF oznaczano przed i po inkubacji przy użyciu spektrofluorymetru LS-50B przy długości fali pobudzającej 488nm i emitowanej 530nm. Przedstawione dane są wartościami z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach (średnia  $\pm$  SD).

Znamienność oznaczono metodą ANOVA przy użyciu testu Newmana-Keulsa,  $*p < 0,05$  w stosunku do kontroli.

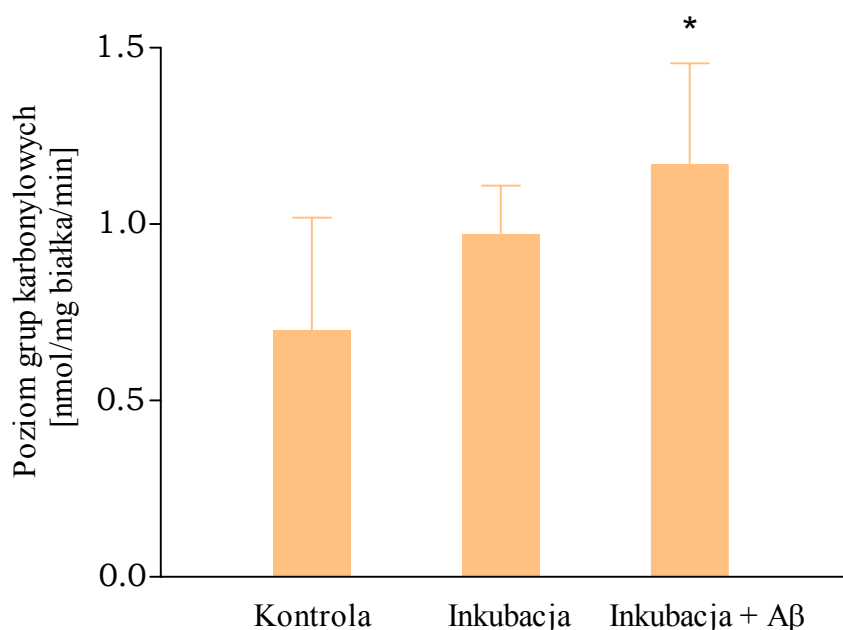
Stwierdzono, że A $\beta$  1-40 oraz A $\beta$  1-42 w formie zagregowanej stymulują oksydację lipidów błon synaptoplazmatycznych o 50% i 40% odpowiednio. W przypadku peptydu A $\beta$  25-35 nie stwierdzono wzrostu stężenia końcowego produktu oksydacji lipidów (Rycina 35).



**Rycina 35. Oksydacja lipidów błon synaptoplazmatycznych w korze mózgu w wyniku działania peptydów A $\beta$ .**

Peroksydację lipidów w błonach synaptoplazmatycznych oznaczano poprzez pomiar poziomu związków reagujących z kwasem tiobarbituranowym (TBARS). Błony synaptoplazmatyczne inkubowano 5 min z A $\beta$  lub bez A $\beta$  (kontrola). Wyniki przedstawiają wartości z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Znamienność oznaczono metodą ANOVA, przy użyciu testu Newmana-Keulsa.  $*p < 0,05$  w stosunku do kontroli.

Zagregowany  $A\beta$  1-42 aktywuje oksydację białek błon synaptoplazmatycznych oznaczaną poprzez pomiar powstałych grup karbonylowych w czasie 30 minutowej inkubacji w 37°C (Rycina 36)

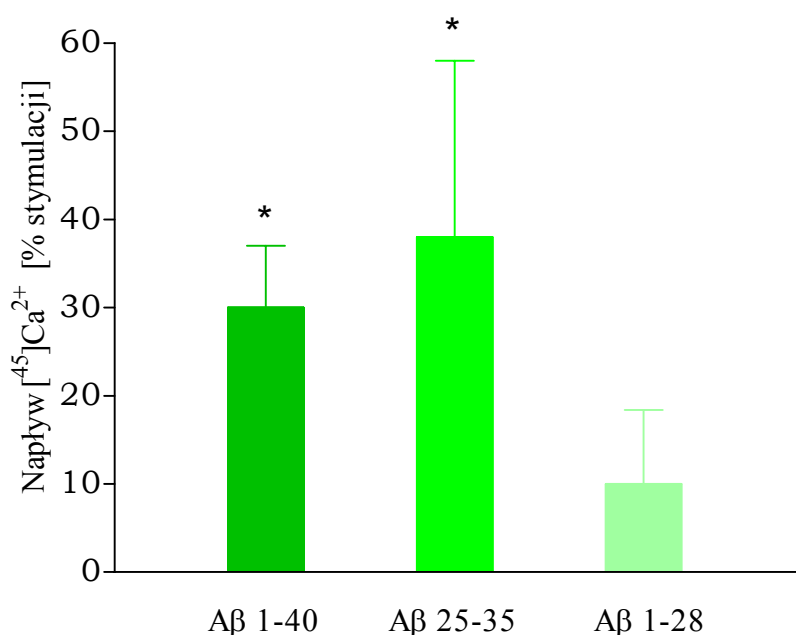


**Rycina 36. Rola peptydów  $A\beta$  w oksydacji białek błon synaptoplazmatycznych w korze mózgu.**

Z kory mózgu izolowano błony synaptoplazmatyczne i inkubowano 30 min w 37°C z zagregowanym  $A\beta$  1-42 w 25  $\mu$ M stężeniu lub bez  $A\beta$ . Następnie oznaczano oksydację białek w SPM poprzez pomiar poziomu grup karbonylowych przy użyciu DNPH. Wyniki przedstawiają wartości z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Znamienność oznaczono metodą ANOVA, przy użyciu testu Newmana-Keulsa. \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (SPM bez inkubacji).

### V.5.2 Efekt A $\beta$ na napływ jonów Ca<sup>2+</sup> oraz na aktywację cytozolowego czynnika w synaptosomach odpowiedzialnego za degradację DNA jądrowego.

Podjęte badania miały na celu zbadanie wpływu peptydów A $\beta$  na napływ jonów wapnia do synaptoneurozomów i synaptosomów z kory mózgu oraz określenie udziału A $\beta$  w zjawiskach prowadzących do aktywacji synaptosomalnego cytozolowego czynnika biorącego udział w degradacji DNA jądrowego. Wpływ peptydów A $\beta$  na napływ jonów wapnia badano we frakcji synaptoneurozomalnej i synaptosomalnej w obecności radioaktywnego [<sup>45</sup>]CaCl<sub>2</sub>. Zaobserwowano, że A $\beta$  25-35 oraz A $\beta$  1-40 w formie zagregowanej stymulują napływ jonów wapnia do synaptoneurozomów o około 30-40%, podczas gdy A $\beta$  1-28 pozostaje bez wpływu na ten proces (**Rycina 37**).

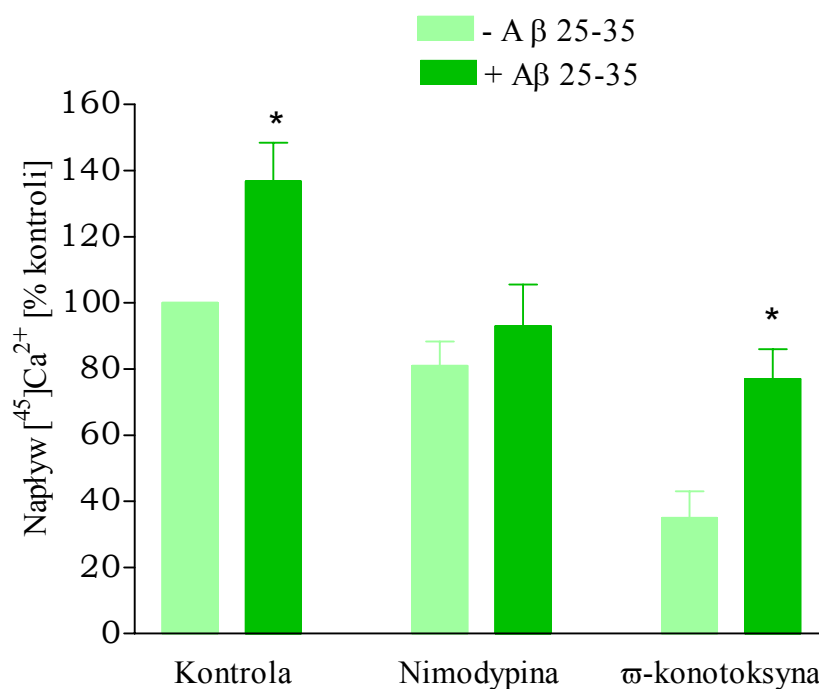


**Rycina 37. Zależny od peptydów A $\beta$  napływ jonów wapnia do synaptoneurozomów z kory mózgu.**

Zawiesinę synaptoneurozomów preinkubowano 10 min w 37 °C w środowisku karbogenu z peptydami A $\beta$  w 25  $\mu$ M stężeniu lub bez A $\beta$  (kontrola). Napływ zewnątrzkomórkowego wapnia oznaczano przy użyciu radioaktywnego [<sup>45</sup>Ca]Cl<sub>2</sub>. Wyniki wyrażone w procentach stymulacji napływu wapnia przez peptydy A $\beta$  w stosunku do synaptoneurozomów kontrolnych przedstawiają wartości z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Znamienność oznaczono metodą ANOVA, przy użyciu testu Newmana-Keuls. \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli.



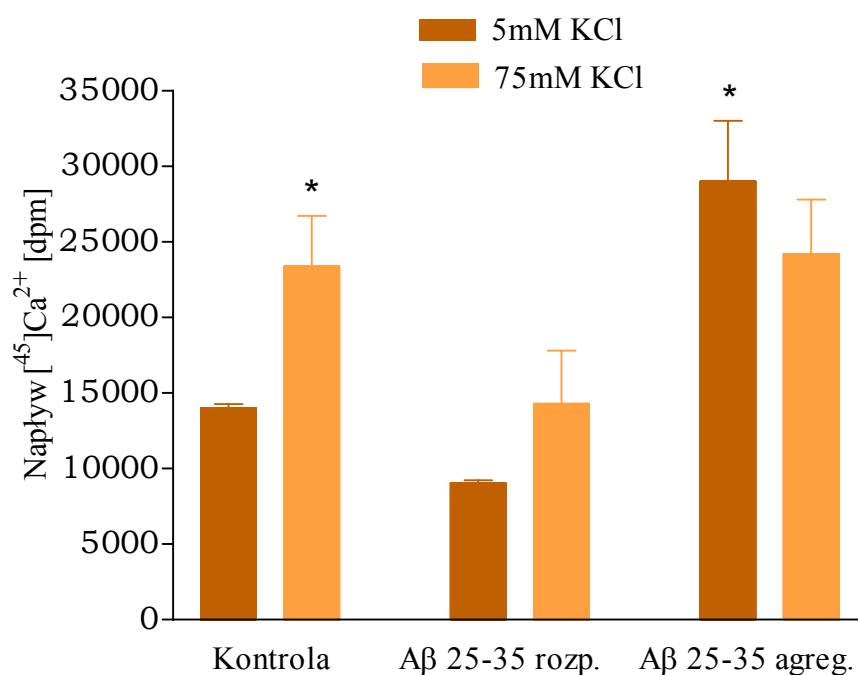
Zastosowanie 1mM nimodypiny lub 10 $\mu$ M  $\omega$ -konotoksyny, specyficznego blokera kanałów typu L lub N zależnych od potencjału (VOCC) obniża podstawowy napływ  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  do synaptoneuzomów o około 20% i 40% odpowiednio. W obecności nimodypiny A $\beta$  25-35 nie powoduje napływu wapnia do synaptoneurozomów, natomiast w obecności  $\omega$ -konotoksyny peptyd ten stymuluje napływ  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (**Rycina 38**). Wyniki te wskazują, że A $\beta$  25-35 zwiększa napływ jonów wapnia przez zależny od potencjału kanał typu L natomiast pozostaje bez wpływu na kanał N.



**Rycina 38. Wpływ nimodypiny i  $\omega$ -konotoksyny, blokerów kanałów wapniowych typu L i N zależnych od potencjału na podstawowy i wywołany przez A $\beta$  25-35 napływ wapnia do synaptoneurozomów z kory mózgu.**

Zawiesinę synaptoneurozomów preinkubowano 10 min w 37 °C w środowisku karbogenicznym z 1mM nimodypiną lub 10 $\mu$ M  $\omega$ -konotoksyną. Następnie dodawano A $\beta$  25-35 w 25 $\mu$ M stężeniu i inkubację kontynuowano przez kolejne 10 min. Napływ wapnia oznaczano przy użyciu radioaktywnego [ $^{45}\text{Ca}$ ]Cl $_2$  i przedstawiono jako procenty kontroli (preinkubacja bez A $\beta$  i blokerów kanałów wapniowych). Wyniki przedstawiają wartości z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Znamienność oznaczono metodą ANOVA, przy użyciu testu Newman-Keulsa. \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli, # $p < 0,05$  w stosunku do inkubacji z  $\omega$ -konotoksyną.

Podobnie w synaptozomach z kory mózgu A $\beta$  25-35 wyłącznie w formie agregowanej stymuluje napływ jonów wapnia. Peptyd ten potencjalizuje napływ wapnia do synaptozomów w obecności 5mM KCl natomiast nie ma wpływu na wywołany przez 75mM KCl (**Rycina 39**).

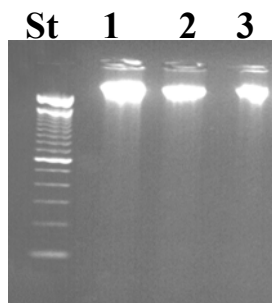


**Rycina 39. Zależny i niezależny od depolaryzacji napływ  $Ca^{2+}$  do synaptozomów z kory mózgu pod wpływem działania A $\beta$  25-35.**

Synaptozomy były preinkubowane 10 min w 37 °C w środowisku karbogenu z A $\beta$  25-35 w 25 $\mu$ M stężeniu. Następnie oznaczano napływ wapnia przy użyciu radioaktywnego [ $^{45}$ Ca]Cl $_2$  w obecności 5mM KCl lub 75mM KCl. Wyniki przedstawiają wartości z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Znamienność oznaczono metodą ANOVA, przy użyciu testu Newman-Keulsa. \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (inkubacja synaptozomów z 5mM KCl).

Po inkubacji synaptozomów z peptydami A $\beta$  izolowano cytozol i badano jego wpływ na degradację DNA we frakcji jądrowej. Integralność DNA badano również we frakcji jąder komórkowych po ich inkubacji z peptydami A $\beta$ . Stwierdzono, że inkubacja frakcji jądrowej w temperaturze 37°C przez 2 godziny w obecności 2mM CaCl $_2$  lub

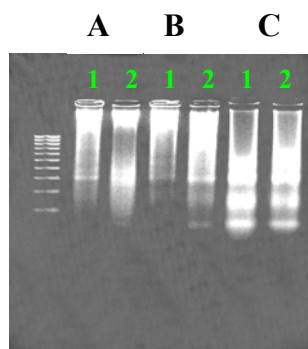
zagregowanego  $A\beta$  25-35 w  $50\mu\text{M}$  stężeniu nie powoduje degradacji DNA (**Rycina 40**).



**Rycina 40. Efekt  $A\beta$  25-35 na degradację DNA jądrowego.**

*Jądra komórkowe izolowane z kory mózgu z hipokampami inkubowane były przez 2 godziny w  $37^\circ\text{C}$  w mieszaninie inkubacyjnej zawierającej  $2\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$  lub  $A\beta$  25-35 w  $50\mu\text{M}$  stężeniu lub bez tych związków (kontrola). Następnie izolowano DNA i oznaczano jego integralność stosując elektroforezę na żelu agarozowym. St – standard, 1 – kontrola, 2 -  $2\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ , 3 -  $A\beta$*

Inkubacja frakcji jądrowej z cytozolem kontrolnym (cytozol wyizolowany z synaptozomów inkubowanych 4 godziny w  $37^\circ\text{C}$  bez  $A\beta$ ) przez 30 min w  $37^\circ\text{C}$  powoduje niewielką degradację DNA, natomiast inkubacja frakcji jądrowej z cytozolem wyizolowanym z synaptozomów inkubowanych 4 godziny w  $37^\circ\text{C}$  w obecności  $A\beta$  wywołuje widoczną degradację DNA (**Rycina 41 A**). Po 60 minutach inkubacji frakcji jądrowej widoczna jest już „drabinka apoptotyczna” (**Rycina 41 B**). Po 2 godzinach inkubacji drabinka apoptotyczna widoczna jest zarówno we frakcji jądrowej inkubowanej z cytozolem synaptozomalnym wyizolowanym z synaptozomów kontrolnych jak również inkubowanej z cytozolem uzyskanym z synaptozomów inkubowanych w obecności  $A\beta$  (**Rycina 41 C**).



**Rycina 41. Aktywacja synaptozomalnego czynnika wywołującego degradację DNA jądrowego przez A $\beta$  25-35.**

Z kory mózgu z hipokampami izolowano synaptozomy i inkubowano je w inkubatorze do hodowli komórkowej w 37°C przez 4 godziny w buforze Locke'a z A $\beta$  lub bez A $\beta$  (kontrola). Następnie z synaptozomów izolowano cytozol i używano go do inkubacji z frakcją jądrową wyizolowaną z kory mózgu w następujących warunkach:

**A:**

- 1 frakcja jądrowa inkubowana 30 min w 37°C z cytozolem synaptozomalnym kontrolnym (cytozol uzyskany z synaptozomów inkubowanych 4 godz. w 37°C bez A $\beta$ )
- 2 frakcja jądrowa inkubowana 30 min. w 37°C z cytozolem synaptozomalnym uzyskanym z synaptozomów inkubowanych 4 godz. w 37°C w obecności A $\beta$

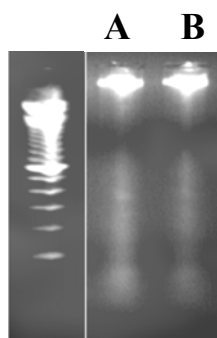
**B:**

- 1 frakcja jądrowa inkubowana 60 min w 37°C z cytozolem synaptozomalnym kontrolnym
- 2 frakcja jądrowa inkubowana 60 min. w 37°C z cytozolem synaptozomalnym uzyskanym z synaptozomów inkubowanych 4 godz. w 37°C w obecności A $\beta$

**C:**

- 1 frakcja jądrowa inkubowana 2 godziny w 37°C z cytozolem synaptozomalnym kontrolnym
- 2 frakcja jądrowa inkubowana 2 godziny w 37°C z cytozolem synaptozomalnym uzyskanym z synaptozomów inkubowanych 4 godz. w 37°C w obecności A $\beta$

W celu zweryfikowania hipotezy o udziale kaspazy 3 w zjawiskach prowadzących do degradacji DNA do badań użyto inhibitora kaspazy 3 Ac-DEVD-CMK (Calbiochem). Stwierdzono, że inkubacja frakcji jądrowej w obecności cytozolu wyizolowanego z synaptozomów inkubowanych z inhibitorem kaspazy 3 (100 $\mu$ M Ac-DEVD-CMK) i z A $\beta$  1-40 zmniejsza degradację DNA wywołaną działaniem A $\beta$  (**Rycina 42**).



**Rycina 42. Udział inhibitora kaspazy-3 w regulacji degradacji DNA wywołanej działaniem  $A\beta$  1-40.**

Z kory mózgu z hipokampami izolowano synaptozomy i inkubowano je w inkubatorze do hodowli komórkowej w 37°C przez 4 godziny w buforze Locke'a z 50  $\mu$ M  $A\beta$  1-40 (kontrola) lub z  $A\beta$  i 100  $\mu$ M Ac-DEVD-CMK. Następnie z synaptozomów izolowano cytozol i używano go do inkubacji z frakcją jądrową wyizolowaną z kory mózgu w następujących warunkach:

**A:**

frakcja jądrowa inkubowana 2 godz. w 37°C z cytozolem synaptozomalnym uzyskanym z synaptozomów inkubowanych 4 godz. w 37°C w obecności  $A\beta$

**B:**

frakcja jądrowa inkubowana 2 godz. w 37°C z cytozolem synaptozomalnym uzyskanym z synaptozomów inkubowanych 4 godz. w 37°C w obecności  $A\beta$  i inhibitora kaspazy-3, Ac-DEVD-CMK

## VI DYSKUSJA

Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy wykazały, że peptydy A $\beta$  obniżają aktywność acetylotransferazy cholinowej (ChAT) wyłącznie w prążkowie starczym prawdopodobnie w wyniku większej wrażliwości ChAT w tej strukturze mózgu na działanie wolnego kwasu arachidonowego lub wolnych rodników uwalnianych przez A $\beta$ . ApoE4 również obniża aktywność ChAT wyłącznie w prążkowie, a nie wpływa na ten enzym w korze mózgu. Mechanizmy regulacji ChAT do chwili obecnej pozostają nie wyjaśnione. W literaturze istnieją kontrowersyjne dane wskazujące na udział fosforylacji w regulacji tego enzymu (Bruce i Hersh, 1989, Issa i wsp., 1996, Borlongan i wsp., 2000). Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że procesy fosforylacji i defosforylacji nie biorą udziału w modulacji aktywności ChAT, bowiem zahamowanie kinaz: PKC, PKA, PKG oraz fosfatazy 2A nie wpływa na jej aktywność. Aktywność tego enzymu nie zależy od stężenia jonów wapnia. Istotnym regulatorem aktywności ChAT jest kwas arachidonowy. Dotychczas sugerowano, że kwas arachidonowy obniża poziom acetylocholiney poprzez inhibicję wychwytu choliny, substratu dla tego enzymu (Boksa i wsp., 1988). Badania ostatnich lat (Kristofikova i wsp., 1998) wykazały, że KA nieodwracalnie obniża transport choliny poprzez system transportu o wysokim powinowactwie do choliny (HACU). KA jest substratem dla cyklooksygenaz, lipooksygenaz i epoksygenaz współdziałających z cytochromem P<sub>450</sub>. W wyniku działania tych enzymów z KA powstają liczne związki o ogólnej nazwie eikozanoidy i dochodzi do wytwarzania wolnych rodników tlenowych (ROS). Atak wolnych rodników na wielonienasycone kwasy tłuszczowe w tym kwas arachidonowy w cząsteczce lipidu powoduje ich peroksydację (Vento i wsp., 2000). Kwas arachidonowy jest pierwotnym (zwrotnym) i wtórnym przekaźnikiem informacji, modulatorem procesów neuroprzekaznictwa (Almeida i wsp., 1999). Wpływa na uwalnianie glutaminianu i jest modulatorem kanałów jonowych (Meves, 1994). Bierze udział w regulacji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (Katsuki i Okuda, 1995). Związek ten aktywuje PLC $\gamma$  (Hwang i wsp., 1996), jest modulatorem PKC (Carricaburu i Fournier, 2001) i kaspazy 3, wpływa na homeostazę wapniową poprzez uwalnianie jonów Ca<sup>2+</sup> z wewnątrzkomórkowych magazynów, jest aktywatorem apoptozy (Wolf i Laster, 1999). Wyniki przedstawione w tej pracy wskazują i są zgodne z obserwacjami Ninomiya i wsp., 1998, że wolne kwasy tłuszczowe w tym kwas arachidonowy obniżają

aktywność ChAT. Mechanizm tej inhibicji pozostaje jednak nie wyjaśniony. Wyniki badań zaprezentowane w niniejszej pracy wykazały, że acetylotransferaza cholinowa jest modulowana przez proces starzenia, znamienne obniżenie aktywności tego enzymu zaobserwowano w korze mózgu i prążkowie u zwierząt 24-miesięcznych w stosunku do dorosłych. Jednym z czynników odpowiedzialnych za inhibicję tego enzymu może być kwas arachidonowy uwalniany z fosfolipidów błon plazmatycznych w procesie starzenia lub jego metabolity i wolne rodniki. Istotnym inhibitorem acetylotransferazy cholinowej w prążkowie jest nadtlenuk wodoru, co wskazuje, że związek ten może być także odpowiedzialny za obniżenie aktywności ChAT w tej strukturze mózgu. W literaturze istnieją rozbieżne dane dotyczące aktywności tego enzymu w procesie starzenia. Obserwowano obniżenie, wzrost bądź brak zmian w aktywności acetylotransferazy cholinowej w mózgach starczych w porównaniu do dojrzałych (Smith, 1990, Hiramatsu i wsp., 1992, Dournaud i wsp., 1994, Ogawa i wsp., 1994, Yufu i wsp., 1994, Baxter i wsp., 1999). Wyniki przedstawione w tej pracy są w znacznej mierze zgodne z obserwacjami Ogawy i wsp., 1994, który wykazał, że aktywność ChAT ulega obniżeniu w korze mózgu, prążkowie, ale również w hipokampie u zwierząt starych. Badania Ogawy i wsp., 1994 wskazują, że obniżenie aktywności enzymu u zwierząt starych nie jest związane z zaburzeniem ekspresji genu dla ChAT, ponieważ poziom mRNA nie zmieniał się u zwierząt starych w stosunku do dorosłych, a za obniżenie aktywności enzymu mogą być odpowiedzialne czynniki wywołujące modyfikacje posttranskrypcyjne. Wyniki badań przedstawione w tej pracy wskazują, że czynnikami tymi mogą być kwas arachidonowy oraz nadtlenuk wodoru. W niniejszej pracy zbadano wpływ różnych form peptydów amyloidu beta na aktywność ChAT w mózgach dojrzałych i starczych. Zaobserwowano, że wyłącznie agregowane peptydy A $\beta$  obniżają aktywność ChAT, ale tylko w prążkowie u zwierząt starych. A $\beta$  zwiększa inhibicję enzymu wywołaną przez proces starzenia w tej strukturze mózgu. Przedstawione wyniki badań korespondują z danymi uzyskanymi z badań prowadzonych na mózgach alzheimerowskich. Aktywność tego enzymu jest obniżona w korze mózgu i prążkowie u pacjentów z chorobą Alzheimera (Marchbanks, 1982, Bird i wsp., 1983). Uwalniany przez peptydy A $\beta$  kwas arachidonowy może być odpowiedzialny za inhibicję tego enzymu w mózgach alzheimerowskich. W prążkowie z mózgow alzheimerowskich stwierdzono obniżone stężenie ChAT (Boissiere i wsp., 1997). Peptydy A $\beta$  mogą również obniżać aktywność ChAT poprzez obniżenie syntezy

tęgo enzymu w prążkowiu, strukturze bardzo bogatej w neurony cholinergiczne. Do chwili obecnej opublikowano kontrowersyjne dane dotyczące udziału peptydów A $\beta$  w modulacji aktywności ChAT. Badania prowadzone były na liniach komórkowych zmodyfikowanych pod względem genetycznym i biochemicznym. Wyniki uzyskane na komórkach neuroblastomy wykazały, że peptydy A $\beta$  1-42 oraz 1-28 w stężeniach od piko- do nanomolarnych obniżają poziom acetylocholino oraz aktywność ChAT (Pedersen i wsp., 1996, Pedersen i wsp., 1997), natomiast w hodowli pierwotnej neuronów z kory mózgu A $\beta$  1-42 w 10 $\mu$ M stężeniu nie wpływał na aktywność enzymu (Hoshi i wsp., 1997). Wyniki badań przedstawione w tej pracy wskazują, że A $\beta$  poprzez inhibicję acetylotransferazy cholinowej w prążkowiu może istotnie uszkadzać przekaźnictwo informacji w układzie cholinergicznym na poziomie syntezy neurotransmitera tego układu. Ponadto peptydy A $\beta$  zaburzają wytwarzanie wtórnych lipidowych przekaźników informacji, DAG i IP $_3$ . Zagregowane formy peptydów, A $\beta$  1-40 oraz ich neurotoksyczny fragment A $\beta$  25-35 obniżają aktywność PIP $_2$ -PLC zależną od pobudzenia muskarynowego receptora cholinergicznego i białek G oraz aktywność konstytutywną PIP $_2$ -PLC niezależną od aktywacji receptora. Działanie peptydów A $\beta$  zależy od ich agregacji. Peptydy A $\beta$  nie zagregowane pozostawały bez wpływu na degradację fosfolipidów inozytolowych. Kelly i wsp., 1996, Crews i wsp., 1994, Jope, 1996 i Jope i wsp., 1997 wykazali, że hydroliza fosfoinozytydów zależna od pobudzenia receptora cholinergicznego jest obniżona w błonach synaptoplazmatycznych z mózgow alzheimerowskich. W mózgach alzheimerowskich zaobserwowano obniżenie hydrolizy PIP $_2$  po stymulacji karcholem i GTP( $\gamma$ )S (Crews i wsp., 1994). Badacze Ci sugerowali, że obniżenie degradacji PIP $_2$  spowodowane jest uszkodzeniem układu receptor-białko G-PLC, wskazywali na rozprężenie interakcji białka G z receptorem lub enzymu z białkiem G. Wyniki badań przedstawionych w tej pracy sugerują, że peptydy A $\beta$  mogą być odpowiedzialne za stwierdzone zaburzenie fosfoinozytydowej drogi przekaźnictwa informacji w mózgach alzheimerowskich. Uzyskane wyniki badań wskazują, że peptydy A $\beta$  powodują istotne obniżenie aktywności PIP $_2$ -PLC zależnej od pobudzenia receptora muskarynowego i białek G oraz niezależnej od pobudzenia receptora. Dane te sugerują, że A $\beta$  może również modulować konstytutywną aktywność PIP $_2$ -PLC. Degradacja PIP $_2$  odbywa się przy udziale izoformy PLC $\beta$  regulowanej przez białka G i receptor muskarynowy w układzie cholinergicznym. Wyniki prezentowane w



niniejszej pracy wskazują na znaczną wrażliwość PLC $\beta$  na działanie peptydów A $\beta$ . Liczne dane literaturowe wskazują, że peptydy A $\beta$  aktywują stres oksydacyjny (Varadarajan i wsp., 1999, Miranda i wsp., 2000, Butterfield i Kanski, 2002, Butterfield i Lauderback, 2002). Uzyskane wyniki badań wskazują, że zagregowany A $\beta$  1-40/1-42 aktywuje zależną od wolnych rodników oksydację lipidów i białek błon synaptoplazmatycznych. Wyrazem tych procesów jest obserwowany wzrost stężenia dialdehydu malonylowego, produktu oksydacji lipidów oraz wzrost grup karbonylowych, które są wskaźnikiem oksydacji białek. Dane te sugerują, że wolne rodniki nagromadzone w wyniku działania peptydów A $\beta$  lub zmiany błon i samego enzymu w wyniku zwiększonej oksydacji lipidów i białek mogą być odpowiedzialne za obniżenie aktywności PLC $\beta$ , a tym samym obniżenie aktywności procesów przekaźnictwa informacji zależnej od wtórnych przekaźników DAG i IP $_3$ . Sygnał przekazywany od receptorów muskarynowych układu cholinergicznego do fosfolipazy C (PIP $_2$ -PLC) dociera do jądra komórkowego w wyniku licznych nie do końca poznanych procesów. Badania przedstawione w tej pracy wskazują, że jądrowym odbiorcą sygnału od receptora muskarynowego może być enzym jądrowy PARP. Pobudzenie receptorów muskarynowych wywołuje 100% aktywację tego enzymu w hipokampie oraz 50% w korze mózgu. Zastosowanie TMB-8, inhibitora receptora dla IP $_3$  likwiduje stymulację PARP-u wywołaną przez pobudzenie receptora muskarynowego układu cholinergicznego. Wyniki tych badań wskazują, że w aktywacji tego enzymu w hipokampie pośredniczy wapń uwalniany przez IP $_3$  powstający w wyniku degradacji PIP $_2$  przez PLC. PARP może być odbiorcą sygnału przekazywanego na drodze fosfoinozytydowej od receptorów muskarynowych układu cholinergicznego poprzez degradację PIP $_2$ , uwalnianie IP $_3$  i mobilizację wewnątrzkomórkowego wapnia. Badania ostatnich lat wykazały, że depolaryzacja błon plazmatycznych neuronów kory mózgu prowadzi do aktywacji PARP-u poprzez wapń uwalniany za pośrednictwem IP $_3$  z siateczki śródplazmatycznej (Homburg i wsp., 2000). Badacze Ci po raz pierwszy wykazali, że PARP może być aktywowany w wyniku mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego i że aktywacja ta jest niezależna od uszkodzenia nici DNA. W badaniach tych wykluczono udział tlenku azotu (NO) oraz endonukleaz, które miałyby prowadzić do uszkodzenia DNA. Sugerowano, że PARP jest odbiorcą sygnału przekazywanego przez IP $_3$ . Kontrowersyjne dane wskazują, że przekaźnictwo informacji na drodze glutaminianergicznego z udziałem receptorów NMDA i neuronalnej

formy syntazy tlenku azotu (nNOS) może również prowadzić do aktywacji PARP-u poprzez przejściowe uszkodzenie nici DNA (Pieper i wsp., 2000). Badacze Ci sugerują, że neurotransmisja zależna od receptora NMDA prowadzi do przerywania ciągłości nici DNA i aktywacji PARP-u w warunkach fizjologicznych w nieuszkodzonych neuronach, ale tylko w ściśle określonych rejonach mózgu. PARP spełniałby rolę odbiorcy sygnału od receptora NMDA przy udziale NO i poprzez przejściowe uszkodzenie DNA włączone w proces przekazywania informacji. Bardzo trudno jest wykluczyć czy pobudzenie receptora muskarynowego układu cholinergicznego nie wywołuje jednoniciowego uszkodzenia DNA. PARP jest jednym z najczulszych wskaźników takiego uszkodzenia. Obecnie zwraca się uwagę na jego rolę w procesie przekazywania informacji. Istnieją dane literaturowe wskazujące na udział PARP-u w modulacji czynnika NFκB (Chang i Alvarez-Gonzalez, 2001) oraz białka p53 (Wesierska-Gadek i Schmid, 2001). Poprzez modulację czynników transkrypcyjnych PARP miałby wpływać na ekspresję genów. Obecnie istnieją dane wskazujące na pośredni udział PARP-u w ekspresji genów dla iNOS. Izoforma PARP-1 wchodzi w bezpośrednią interakcję z podjednostką p50 i p65 białka NFκB i poprzez tę interakcję białko-białko moduluje aktywność czynnika transkrypcyjnego i ekspresję genu dla NOS (Hassa i wsp., 2001). Wyniki badań przedstawione w tej pracy wykazały, że agregowany Aβ 25-35 stymuluje aktywność PARP w hipokampie, a pozostaje bez wpływu na ten enzym w korze mózgu. Podobnie w komórkach PC12 zaobserwowano, że zagregowany Aβ 25-35 stymuluje aktywność tego enzymu (Strosznajder i Banasik 2000). Wiadomo, że PARP jest aktywowany przez uszkodzenie nici DNA wywołane działaniem wolnych rodników lub innych czynników uszkadzających DNA (Virag i wsp., 1999, Jeggo, 1998). Badania Strosznajder i wsp., 2000 wykazały, że NO oraz inne wolne rodniki są odpowiedzialne za wywołaną działaniem Aβ aktywację PARP-u w hipokampie. Z kolei wiadomo, że peptydy Aβ w chorobie Alzheimera odkładają się w pobliżu zakończeń synaptycznych przede wszystkim w hipokampie i właśnie w tej strukturze powodują najintensywniejsze procesy neurodegeneracyjne. W przeciwieństwie do kory mózgowej hipokamp jest strukturą mózgu bardziej podatną na działanie czynników uszkadzających w tym peptydów Aβ. Przyczyna większej wrażliwości tej struktury nie jest w pełni poznana. Istnieje możliwość, że odpowiedzialna jest za to większa niż w innych strukturach mózgu gęstość receptorów NMDA i mniejsza wydolność antyoksydacyjna w hipokampie. Toksyczne działanie Aβ może być spowodowane

stresem oksydacyjnym wywołanym działaniem wolnych rodników oraz nadtleniem wodoru (Behl i wsp., 1994). Badania przedstawione w tej pracy wykazały, że wyłącznie długołańcuchowe zagregowane formy peptydów A $\beta$  stymulują zależną od uwalniania wolnych rodników oksydację lipidów, A $\beta$  25-35 nie powodował uchwytanych zmian procesów wolnorodnikowych. Peptyd ten stymuluje jednak aktywność PARP w hipokampie co wskazuje na wolnorodnikowe uszkodzenie nici DNA. Dotychczasowe badania wykazały, że PARP jest pierwszym i najbardziej czułym wskaźnikiem uszkodzenia DNA wywołanego działaniem wolnych rodników (Zhang i wsp., 1995). Aktywacja PARP-u w hipokampie przez agregowany A $\beta$  25-35 może być spowodowana uwalnianiem wolnych rodników w wyniku zaburzenia homeostazy jonów wapnia. W tej pracy wykazano, że A $\beta$  25-35 stymuluje napływ jonów wapnia przez kanały wapniowe zależne od potencjału typu L. Napływ Ca<sup>2+</sup> może prowadzić do aktywacji fosfolipazy A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), konstytutywnej izoformy NOS oraz aktywacji endonukleaz i uszkodzenia DNA, co z kolei wywołuje aktywację PARP-u. Ten wzrost aktywności PARP-u w wyniku uszkodzenia nici DNA niewielkiego stopnia wskazuje o jego udziale w naprawie DNA. Przedłużające się w czasie działanie A $\beta$  i znaczne uszkodzenie DNA może poprzez nadmierną aktywację PARP-u i wyczerpanie NAD i ATP doprowadzić do obumierania komórek. Peptydy A $\beta$  w tym także długołańcuchowy A $\beta$  1-40 nie aktywują PARP-u w korze mózgu. Najprawdopodobniej mechanizmy antyoksydacyjne w tej strukturze mózgu są lepiej wykształcone niż w hipokampie. Znacznie mniejsza jest również gęstość receptorów NMDA i ich wrażliwość na agonistę w korze mózgu. W przeciwieństwie do hipokampa nie obserwuje się również zależnej od receptora NMDA aktywacji PARP-u (Strosznajder i wsp., 2000). Agregowane peptydy amyloidu beta, A $\beta$  25-35 oraz 1-40 znoszą aktywację PARP-u w korze mózgu wywołaną działaniem karbacholu i GTP( $\gamma$ )S. Efekt ten może być spowodowany w pewnej mierze inhibicją PIP<sub>2</sub>-PLC, a tym samym obniżonym uwalnianiem IP<sub>3</sub> przez te peptydy. W hipokampie peptydy A $\beta$  powodują wzrost aktywności PARP-u, która maskuje jego hamujący efekt na aktywność PARP-u zależną od receptora cholinergicznego. Obserwowany efekt wynika najprawdopodobniej z działania samego A $\beta$ . Nie stwierdza się efektu synergistycznego co świadczy o różnych mechanizmach pobudzenia PARP-u w obu wymienionych warunkach, działania A $\beta$  i pobudzenia muskarynowego receptora cholinergicznego. Wyniki te po raz pierwszy wskazują, że

agregowane peptydy A $\beta$  25-35 oraz A $\beta$  1-40 poprzez inhibicję PIP<sub>2</sub>-PLC zależną od receptora obniżają albo eliminują przekazywanie informacji na drodze fosfoinozytydowej do jądra komórkowego.

Istotną rolę w fosfoinozytydowej transdukcji sygnału pełni fosfolipaza C degradująca PI (PI-PLC). W procesie degradacji PI przez PLC powstaje DAG, który poprzez podtrzymywanie stężenia małej puli DAG uwalnianej z PIP<sub>2</sub> może być wykorzystywany do wzmocnienia przekaźnictwa informacji poprzez aktywację PKC. Fosfolipidy inozytolowe poprzez zależną od DAG aktywację PKC mogą być zaangażowane w regulację degradacji białka prekursorowego amyloidu beta. Badania przedstawione w tej pracy wykazały, że PI-PLC wykazuje znacznie wyższą aktywność w cytozolu niż w błonach synaptoplazmatycznych i jest aktywowana przez jony wapnia. W obecności helatora jonów wapnia, 1mM EGTA enzym ten wykazuje minimalną aktywność, a w wyższych stężeniach EGTA (2-10mM) nie stwierdza się aktywności enzymu. Ponadto aktywność PI-PLC nie jest zależna od pobudzenia receptora muskarynowego i białek G. Dane te sugerują, że za degradację PI odpowiedzialna jest PLC $\delta$ , która jest formą głównie cytozolową aktywowaną przez jony wapnia i nie regulowaną przez białka G. Dane przedstawione w tej pracy wskazują, że ta izoforma odznacza się znacznie mniejszą wrażliwością na działanie peptydów A $\beta$  w porównaniu do PLC $\beta$  degradującej PIP<sub>2</sub>. A $\beta$  25-35 niezależnie od stężenia i stopnia agregacji nie wpływa na aktywność tego enzymu w błonach synaptoplazmatycznych kory mózgu. Podobnie w hipokampie po sześciogodzinnej inkubacji skrawków w obecności A $\beta$  25-35 aktywność PI-PLC nie ulega zmianie. Badania prowadzone na komórkach neuroblastomy (Singh i wsp., 1995, Singh i wsp., 1996, Singh i wsp., 1997) wykazały, że A $\beta$  25-35 stymuluje aktywność PI-PLC i stymulacja ta jest niezależna od jonów wapnia. Rozbieżności w obserwacjach mogą być związane z użyciem do badań komórek nowotworowych. W tej pracy zaobserwowano, że wyłącznie długołańcuchowy A $\beta$  1-40 w formie zagregowanej wywołuje inhibicję PI-PLC w błonach synaptoplazmatycznych i cytozolu. Działanie tego peptydu zależy od obecności jonów wapnia w środowisku inkubacyjnym, w obecności 2mM CaCl<sub>2</sub>, w przypadku maksymalnej stymulacji enzymu A $\beta$  nie wpływa na aktywność PI-PLC w błonach plazmatycznych lub wywiera słaby efekt inhibicyjny na uwalnianie DAG. Powstało pytanie dotyczące mechanizmu poprzez który A $\beta$  powoduje obniżenie aktywności PLC.

Pod uwagę wzięto uwalniane przez A $\beta$  wolne rodniki i zależne od nich procesy oksydacyjne. W tym celu zbadano również wpływ stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem jonów Fe<sup>2+</sup> na aktywność PI-PLC. Wiadomo, że jony żelaza należą do związków towarzyszących peptydom A $\beta$  i aktywują procesy wolnorodnikowe. Jony żelaza pomimo, że znacznie aktywniej niż zagregowany A $\beta$  1-40 stymulują stres oksydacyjny nie wpływają na aktywność PI-PLC. Wskazuje to, że PI-PLC jest formą oporną na działanie wolnych rodników, a inhibicja wywołana przez A $\beta$  1-40 nie jest związana z działaniem rodnika hydroksylowego uwalnianego w reakcji Fentona. Badania Pillot i wsp., 1996 wykazały, że A $\beta$  poprzez interakcję z lipidami błony komórkowej może wpływać na jej płynność, a to z kolei wpływa na funkcję wielu enzymów błonowych w tym prawdopodobnie także PLC. Dane przedstawione w tej pracy nie wykluczają możliwości, że obniżenie aktywności PI-PLC przez A $\beta$  1-40 jest związane z bezpośrednią interakcją A $\beta$  z enzymem, co może wywoływać zmiany w jego konformacji i wpływać na obniżenie aktywności. Dotychczas ukazały się nieliczne dane dotyczące udziału czynników towarzyszących peptydom A $\beta$  w modulacji transdukcji sygnału na drodze fosfoinozytydowej. Obecność peptydów A $\beta$  wydaje się być czynnikiem koniecznym, ale nie wystarczającym do wywołania zaburzeń procesów neurotransmisji w chorobie Alzheimera. W niniejszej pracy zbadano również udział apolipoproteiny E4, związku towarzyszącego peptydom A $\beta$ , w modulacji fosfolipazy C oraz kinaz fosfolipidów inozytolowych. Wcześniejsze badania wykazały, że apoE4 wiąże się hydrofobowo z rozpuszczalną formą peptydów A $\beta$  i promuje ich agregację i fibrylizację (Wiśniewski i Frangione, 1992) i poprzez tę interakcję może przyspieszać odkładanie A $\beta$  w formie blaszek starczych w mózgach alzheimerowskich (Wiśniewski i wsp., 1994). Badania ostatnich lat wykazały, że sama apoE4 niezależnie od peptydów A $\beta$  powoduje podwyższenie wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia (Tolar i wsp., 1999). W neuronach z hodowli pierwotnej apoE stymuluje napływ wapnia zewnątrzkomórkowego poprzez aktywację kanałów wapniowych zależnych od Cd<sup>2+</sup> oraz stymuluje uwalnianie wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych poprzez drogę zależną od białek G (Wang i Gruenstein, 1997). Zaobserwowano również, że apoE obniża stopień ufosforylowania białka tau poprzez stymulację fosfatazy 2A i 2B (Wang i wsp., 1998). Badania ostatnich lat wykazują, że apoE oraz kompleks apoE/A $\beta$  moduluje aktywność PKC, w komórkach neuroblastomy i wpływa na tranlokację PKC-

$\alpha$  (Cedazo-Minguez i wsp., 2001). W mózgach pacjentów z chorobą Alzheimera, u których zaobserwowano podwyższony poziom apoE4 wykazano obniżoną aktywność ChAT (Soininen i wsp., 1995). Wyniki badań przedstawione w tej pracy wykazały, że apoE4 obniża aktywność ChAT w prążkowie i hamuje aktywność PI-PLC w hipokampie i w błonach synaptoplazmatycznych kory mózgu. Cedazo-Minguez i Cowburn, 2001 wykazali, że w komórkach neuroblastomy SH-SY5Y apoE4 nie wpływa na hydrolizę PI natomiast kompleks apoE4/A $\beta$  obniża degradację PI i zależne od karcholu uwalnianie inozytolofosforanów. Badania przedstawione w niniejszej pracy wykazały, że PI-PLC jest hamowana przez apoE4 i peptydy A $\beta$  1-40 natomiast neurotoksyczny fragment A $\beta$  25-35 nawet po 6 godzinach inkubacji skrawków hipokampa pozostaje bez wpływu na PI-PLC. Badania (Pacheco i Jope, 1996) wykazały, że obniżenie degradacji fosfatydyloinozytolu i uwalniania DAG prowadzi do przesunięcia degradacji  $\beta$ APP w kierunku amyloidogennym i stymuluje powstawanie neurotoksycznego A $\beta$ , który z kolei obniża degradację fosfoinozytydów. ApoE4 może więc poprzez inhibicję PI-PLC zaburzać metabolizm fosfoinozytydów i wpływać na uwalnianie neurotoksycznego A $\beta$ . Apolipoproteina E4 po sześciu godzinach inkubacji skrawków z hipokampa wywołuje wzrost immunoreaktywności dla PLC $\delta$ . ApoE4 może wpływać na poziom ekspresji genu dla PLC względnie może powodować zmiany konformacyjne białka. Zmiany białka PLC $\delta$  zarówno ilościowe jak i jakościowe mogą zaburzać funkcje białek cytoszkieletu komórki oraz funkcje jądrowe. W mózgach alzheimerowskich zaobserwowano podwyższony poziom tej izoformy (Shimohama i wsp., 1995). Sugerowano, że nadmierna ekspresja PLC $\delta$  w mózgu może wpływać na tworzenie włókien neurofibrylarnych w mózgach alzheimerowskich (Shimohama i wsp., 1995). Przedstawione w pracy wyniki wykazały, że peptydy A $\beta$  oraz apoE4 modulują aktywności kinaz fosfolipidów inozytolowych odpowiedzialnych za syntezę polifosfoinozytydów: PIP i PIP<sub>2</sub>, związków które są substratami dla fosfolipazy C. Stwierdzono, że proces starzenia jest czynnikiem modulującym fosforylację endogennych fosfolipidów inozytolowych. W korze mózgu i w hipokampie u zwierząt starych zaobserwowano około 50% obniżenie fosforylacji PIP do PIP<sub>2</sub>. Podobnie badania Bothmer i wsp., 1992 wykazały, że w korze mózgu u starych szczurów synteza PIP<sub>2</sub> obniżona jest o około 20%, natomiast poziom PIP nie ulega zmianie. Van Dongen i wsp., 1983 również wykazał obniżenie syntezy PIP<sub>2</sub> w błonach

synaptoplazmatycznych u zwierząt starych. Wyniki badań przedstawione w tej pracy przeprowadzone z użyciem egzogennych substratów i w optymalnych warunkach dla oznaczania aktywności PI-kinazy i PIP-kinazy wykazały, że aktywność tych enzymów nie zmienia się w mózgach starych w porównaniu do dojrzałych. Wyniki te sugerują, że obserwowana inhibicja fosforylacji endogennego PIP do PIP<sub>2</sub> w mózgach starych nie jest związana z obniżeniem aktywności kinaz fosfolipidów inozytolowych w procesie starzenia. Zaburzenie fosforylacji PIP do PIP<sub>2</sub> może być związane z obniżonym poziomem endogennych lipidów i inozytolu u zwierząt starych, a także z zaburzeniem obrotów metabolicznych fosfoinozytydów w procesie starzenia. W mózgach starych obniżony jest poziom *myo*-inozytolu oraz całkowita pula fosfoinozytydów (Stokes i wsp., 1983). W literaturze opisano brak zmian w aktywności PI-4kinazy w mózgach starych lub niewielki wzrost aktywności tego enzymu wyłącznie we frakcji błonowej (Bothmer i wsp., 1994a, Bothmer i wsp., 1994b). W cytozolu z kory mózgow ludzkich aktywność PI-kinazy jest obniżona w mózgach starych (Jolles i wsp., 1993). Aktywność PIP-kinazy nie zmienia się w korze mózgu u zwierząt starych, w cytozolu wykazuje niewielki spadek (Bothmer i wsp., 1994). Wyniki badań przedstawione w tej pracy wykazały, że peptydy A $\beta$  są istotnym czynnikiem modulującym fosforylację endogennych fosfolipidów inozytolowych. Długołańcuchowy A $\beta$  1-42 obniża fosforylację PIP do PIP<sub>2</sub> w korze mózgu i hipokampie u zwierząt dorosłych. W mózgach starych peptydy A $\beta$  pozostają bez wpływu na ten proces. A $\beta$  25-35 podobnie jak A $\beta$  1-42 wywołuje inhibicję fosforylacji endogennych fosfolipidów inozytolowych. Ponadto A $\beta$  1-42 obniża aktywność PI-4kinazy w korze mózgu i nieznamiennie statystycznie w hipokampie u zwierząt dorosłych. Na skutek inhibicji tego enzymu przez A $\beta$  obniżony jest poziom PIP. Jednakże nie zaobserwowano zmian w poziomie radioaktywności endogennego PIP pod wpływem A $\beta$  ponieważ związek ten jest natychmiast metabolizowany do PIP<sub>2</sub>, a przy braku egzogennego substratu aktywność PI-kinazy jest minimalna. Wyniki te sugerują, że obniżona fosforylacja PIP do PIP<sub>2</sub> u zwierząt dorosłych przez A $\beta$  jest wynikiem inhibicji PI-4kinazy przez ten peptyd. Inhibicja PI-4kinazy może prowadzić do obniżenia poziomu substratu dla fosfolipazy C. Ponadto obniżenie aktywności tego enzymu może wywoływać zaburzenia funkcji białek cytoszkieletu oraz białek związanych z endo- i egzocytozą pęcherzyków synaptycznych, a w konsekwencji zaburzać neurotransmisję. Zubenko i wsp., 1999, Bothmer i wsp., 1994a oraz Bothmer i

wsp., 1994b zaobserwowali obniżoną aktywność PI-kinazy w mózгах alzheimerowskich. Przedstawione wyniki badań mogą sugerować, że peptydy A $\beta$  biorą udział w inhibicji aktywności PI-4kinazy obserwowanej w chorobie Alzheimera.

W licznych badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że peptydy A $\beta$  posiadają właściwości neurotoksyczne (Forloni i wsp., 1993, Loo i wsp., 1993, Allen i wsp., 2001). Sugeruje się, że stres oksydacyjny, zaburzenie homeostazy wapniowej oraz aktywacja receptorów glutaminianergiczných są zaangażowane w patologię choroby Alzheimera oraz neurodegenerację wywołaną działaniem A $\beta$  (Mark i wsp., 1996). Wyniki badań prezentowane w niniejszej pracy wykazały, że zagregowany A $\beta$  1-40 oraz A $\beta$  25-35 stymulują napływ jonów wapnia do synaptoneurozomów oraz synaptozomów z kory mózgu. Zastosowanie specyficznego blokera kanałów typu L, nimodypiny hamuje napływ jonów wapnia wywołany przez A $\beta$  25-35. Uzyskane wyniki wskazują, że A $\beta$  25-35 stymuluje napływ Ca<sup>2+</sup> przez kanały wapniowe zależne od potencjału typu L. Podobnie w synaptozomach z kory mózgu wyłącznie agregowany A $\beta$  25-35 aktywuje napływ jonów wapnia. Peptyd ten potencjalizuje napływ wapnia do synaptozomów w obecności 5mM KCl i pozostaje bez wpływu na ten proces w obecności 75mM KCl. Wskazuje to, że jego działanie zależy od depolaryzacji błony. Przedstawione wyniki badań korespondują z danymi opublikowanymi w ostatnich kilku latach. Wykazano, że peptydy A $\beta$  zaburzają wewnątrzkomórkową homeostazę wapniową (Begley i wsp., 1999) oraz stymulują napływ Ca<sup>2+</sup> i aktywność kanałów wapniowych zależnych od potencjału w synaptozomach z kory mózgu (MacManus i wsp., 2000). Badania Ueda i wsp., 1997 wskazują, że A $\beta$  25-35 zwiększa napływ jonów wapnia przez zależne od potencjału kanały wapniowe typu L lub powoduje wzrost liczby tych kanałów w hodowli neuronów z kory mózgu. Z drugiej strony Price i wsp., 1998 zaobserwował, że A $\beta$  1-40 w komórkach mózdzku potencjalizuje napływ Ca<sup>2+</sup> przez kanały typu N. Dotychczas uważano również, że A $\beta$  może sam tworzyć kanał w błonie komórkowej (Arispe i wsp., 1993) lub zwiększać przepuszczalność błony dla jonów wapnia (Fukuyama i wsp., 1994). W niniejszej pracy wykazano, że zagregowany A $\beta$  1-40 stymuluje produkcję wolnych rodników w synaptozomach. Nadmierny napływ wapnia i związane z tym zaburzenie homeostazy wapniowej oraz stres oksydacyjny może uruchamiać w komórce liczne procesy degradacyjne. Wywołany działaniem A $\beta$  wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, wolnych rodników i kwasu



arachidonowego może być sygnałem do śmierci komórki na drodze apoptotycznej (Mattson i wsp., 1989, Cheng i Mattson, 1991, Cheng i wsp., 1994). Badania Mattsona wskazują, że liczne procesy neurodegeneracyjne inicjowane są w zakończeniach synaptycznych. Wyniki badań przedstawione w tej pracy wykazały, że agregowany A $\beta$  25-35 indukuje w cytozolu zakończeń synaptycznych procesy prowadzące do degradacji DNA jądrowego. Peptyd ten oraz 2mM CaCl<sub>2</sub> nie wpływają na degradację DNA jądrowego podczas bezpośredniej inkubacji jąder komórkowych z tymi związkami. Natomiast peptydy A $\beta$  podczas czterogodzinnej inkubacji aktywują w cytozolu synaptozomów czynnik lub też czynniki, które podczas trzydziestominutowej inkubacji z jądrami komórkowymi wywołują degradację DNA jądrowego. Po dłuższej, godzinnej inkubacji frakcji jądrowej z cytozolem synaptozomalnym traktowanym A $\beta$  25-35 degradacja DNA przybiera charakter drabinki apoptotycznej. Po dwugodzinnej inkubacji drabinka apoptotyczna widoczna jest zarówno we frakcji jądrowej inkubowanej z cytozolem synaptozomalnym kontrolnym jak również z cytozolem wyizolowanym po uprzedniej inkubacji synaptozomów z A $\beta$ . W każdym przypadku konieczna jest obecność czynnika cytozolowego. Badania ostatnich lat (Mattson, 2000) wskazywały, że peptydy A $\beta$  inicjują w zakończeniach synaptycznych procesy prowadzące do śmierci komórki na drodze apoptotycznej, tzw. „apoptozę synaptyczną”. Sugerowano, że A $\beta$  aktywuje nieznane czynniki cytozolowe w zakończeniach synaptycznych, które są transportowane w kierunku ciała komórki, gdzie aktywują procesy prowadzące do apoptozy (Keller i wsp., 1997, Mattson, 2000). Ostatnie badania sugerują, że wolne rodniki oraz wapń są czynnikami wywołującymi apoptozę synaptyczną (Mattson, 2000). Uzyskane wyniki zaprezentowane w tej pracy wskazują, że peptydy A $\beta$  poprzez stymulację napływu jonów wapnia przez kanały wapniowe zależne od potencjału typu L lub (i) stymulację powstawania wolnych rodników indukują lokalnie w zakończeniach synaptycznych (synaptozomach) aktywację czynnika(ów) prowadzących do degradacji DNA jądrowego. Przedstawione wyniki badań sugerują, że aktywacja kaspazy-3 przez A $\beta$  może być jednym z czynników indukujących degradację DNA. Zastosowanie inhibitora kaspazy-3 zmniejsza uszkodzenie DNA wywołane działaniem A $\beta$ . Mattson i wsp., 1998 wykazał, że A $\beta$  1-42 oraz A $\beta$  25-35 stymulują aktywność kaspazy-3 w synaptozomach. Prekursory kaspazy-3 obecne w cytozolu synaptozomów mogą być aktywowane przez peptydy A $\beta$  oraz

mogą być istotnym czynnikiem w aktywacji degradacji DNA jądrowego. Postuluje się, że istotnym czynnikiem indukującym fragmentację DNA na drodze apoptotycznej jest kwas arachidonowy (Yasuda i wsp., 1999). KA uwalniany przez peptydy A $\beta$  z lipidów błon synaptoplazmatycznych może być jednym z czynników odpowiedzialnych za aktywację kaspazy-3 i degradację DNA jądrowego. Uważa się, że PI-3 kinaza jest zaangażowana w regulację śmierci komórek na drodze apoptotycznej. Sugeruje się, że szlak PI-3 kinaza/Akt uczestniczy w modyfikacji post-translacyjnej białka BAD. Inhibicja PI-3 kinazy miałaby prowadzić do obniżenia fosforylacji białka BAD, które w formie ufosforylowanej pozostaje w cytozolu i nie wchodzi w interakcje z białkiem BCL2, jest więc bezpieczne dla komórki. Nieufosforylowane białko BAD ma właściwości proapoptotyczne, wiąże się z białkami pro-życiowymi, np. BCL2 i znosi ich funkcję ochronną. Wyniki uzyskane w tej pracy (dane nie prezentowane) wykazały, że zahamowanie aktywności PI-3kinazy pozostawało bez wpływu na aktywację przez A $\beta$  synaptozomalnego czynnika prowadzącego do degradacji DNA.

## VII WNIOSKI

1. Aktywność acetylotransferazy cholinowej jest obniżona w wyniku starzenia w korze mózgu i w prążkowi. Peptydy A $\beta$  powodują znamienne obniżenie aktywności ChAT wyłącznie w prążkowi starczym. Uzyskane wyniki wskazują, że A $\beta$  poprzez uwalnianie kwasu arachidonowego i wolnych rodników może wpływać na zaburzenie funkcji układu cholinergicznego w tej strukturze mózgu prawdopodobnie na skutek większej wrażliwości starczego prążkowie na działanie tych związków.
2. Zagregowane formy peptydów A $\beta$  w wyniku znaczącego obniżenia aktywności fosfolipazy C beta (PLC $\beta$ ) degradującej PIP $_2$  i hamowania uwalniania wtórnych metabolicznych przekaźników informacji takich jak DAG i IP $_3$  mogą być odpowiedzialne za zaburzenie transdukcji sygnału regulowanej przez wymienione mediatory.
3. Stwierdzono po raz pierwszy, że jądrowym odbiorcą sygnału przekazywanego od receptora muskarynowego układu cholinergicznego poprzez degradację PIP $_2$  i uwalnianie IP $_3$  jest enzym jądrowy polimeraza(poli-ADP)rybozy. Zagregowane peptydy A $\beta$  poprzez inhibicję fosfolipazy C zależnej od receptora i obniżenie poziomu IP $_3$  mogą zaburzać przekazywanie informacji do jądra komórkowego na poziomie PARP-u.
4. Zarówno peptydy A $\beta$  jak i apolipoproteina E4 w wyniku obniżenia aktywności PLC $\delta$  degradującej fosfatydyloinozytol i obniżenia poziomu diacyloglicerolu mogą wpływać na degradację  $\beta$ APP w kierunku amyloidogennym.
5. Peptydy A $\beta$  poprzez inhibicję aktywności PI-4kinazy i obniżenie poziomu PIP i PIP $_2$  mogą modulować aktywność PLC i zależne od niej procesy. W wyniku inhibicji aktywności PI-4kinazy peptydy A $\beta$  mogą również powodować zaburzenie funkcji cytoszkieletu komórki. Proces starzenia pozostaje bez wpływu na modulowaną przez peptydy A $\beta$  fosforylację endogennych fosfolipidów inozytolowych.

6. Peptydy A $\beta$  poprzez stymulację napływu jonów wapnia do zakończeń synaptycznych w wyniku pobudzenia zależnego od potencjału kanału wapniowego typu L i aktywacji uwalniania kwasu arachidonowego z fosfoinozytydów indukują w cytozolu zakończeń synaptycznych (synaptozomach) procesy prowadzące do degradacji jądrowego DNA.

## VIII STRESZCZENIE

Peptydy A $\beta$  39/43, produkty degradacji białka prekursorowego amyloidu beta ( $\beta$ APP) obecne są w płynach ustrojowych oraz w płynie zewnątrzkomórkowym w stężeniu pikomolarnym. Stężenie tych peptydów wzrasta w mózgu w procesie starzenia, w różnego typu amyloidozach, po urazach, a przede wszystkim w chorobie Alzheimera. Obecnie uważa się, że peptydy A $\beta$  mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie choroby Alzheimera. Związki te odkładane w postaci płytek starczych w hipokampie i w korze mózgu mogą powodować zaburzenia funkcji licznych układów przekaźnikowych, w tym układu cholinergicznego związanego z przemianami fosfoinozytydów. Uszkodzenie funkcji tego układu może dotyczyć metabolizmu acetylocholin, właściwości receptora, przemian metabolicznych fosfoinozytydów i ich transportu oraz uwalniania i działania przekaźników informacji drugiego rzędu. Mimo intensywnych badań zmierzających do zrozumienia mechanizmu działania A $\beta$  na układ cholinergiczny wiele zagadnień pozostało nadal nie wyjaśnionych. Dotychczasowe prace wykazały, że w warunkach hodowli tkankowej peptydy A $\beta$  hamują wychwyt i transport choliny oraz uwalnianie acetylocholin. Natomiast nieliczne i kontrowersyjne wyniki nie wyjaśniły znaczenia peptydów A $\beta$  w modulacji aktywności acetylotransferazy cholinowej (ChAT), kluczowego enzymu w syntezie acetylocholin. W mózgach alzheimerowskich stwierdzono bardzo wyraźny spadek stężenia acetylocholin oraz obniżenie aktywności ChAT w korze mózgu i w jądrze Meynerta.

Uszkodzenie transdukcji sygnału na drodze fosfoinozytydowej może odbywać się ponadto na etapie wytwarzania metabolicznych przekaźników informacji drugiego rzędu diacyloglicerolu (DAG) i inozytolo-1,4,5-trisfosforanu (IP<sub>3</sub>), uwalnianych w wyniku degradacji fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP<sub>2</sub>) przez fosfolipazę C (PLC). Przemiany metaboliczne PIP<sub>2</sub> zależą również od aktywności kinaz fosfolipidów inozytolowych, PI-4kinazy i PIP-5kinazy, kluczowych enzymów biorących udział w syntezie tego lipidu. Badania mózgow alzheimerowskich wykazały obniżoną degradację fosfoinozytydów zależną od muskarynowego receptora cholinergicznego i białek G oraz obniżenie aktywności PI-4kinazy. Bardzo ważnym zagadnieniem badawczym pozostawało wyjaśnienie znaczenia peptydów A $\beta$  w zaburzeniach aktywności PIP<sub>2</sub>-PLC

oraz PI- i PIP-kinazy, a także białek transportujących fosfatydyloinozitol (PI-TP) z miejsca syntezy do błon synaptoplazmatycznych. Ponadto wyjaśnienia wymagał udział peptydów A $\beta$  w degradacji fosfatydyloinozytolu (PI) przez PLC i uwalnianiu puli DAG, która pełni istotną rolę w podtrzymaniu aktywności PKC, w regulacji metabolizmu  $\beta$ APP i uwalnianiu A $\beta$ . W analizie zjawisk molekularnych odpowiedzialnych za neurotoksyczność peptydów A $\beta$  nie uwzględniono roli apolipoproteiny E4 (apoE4) i innych związków im towarzyszących.

W niniejszej pracy podjęto wobec tego badania zmierzające do wytłumaczenia mechanizmów działania peptydów A $\beta$  w modulacji przemian fosfoinozytydów w mózgu dojrzałym i starym mając na uwadze dane literaturowe wskazujące na większą wrażliwość struktur mózgu starszego na działanie peptydów A $\beta$ .

Podjęte zagadnienia badawcze miały na celu zbadanie udziału peptydów A $\beta$  i związków im towarzyszących w modulacji aktywności ChAT oraz PI- i PIP<sub>2</sub>-PLC podstawowej jak i zależnej od pobudzenia receptora cholinergicznego i białek G. Ponadto zbadano wpływ peptydów A $\beta$  na podstawową i zależną od pobudzenia receptora cholinergicznego i IP<sub>3</sub> aktywność polimerazy(poli-ADP)rybozy (PARP). Celem podjętych badań było również określenie udziału peptydów A $\beta$  w procesach fosforylacji fosfolipidów inozytolowych oraz w regulacji aktywności kinaz tych fosfolipidów. Zbadano ponadto wpływ peptydów A $\beta$  na zależną od lipidowych mediatorów aktywację cytozolowego czynnika(-ów) w synaptozomach odpowiedzialnego za degradację DNA jądrowego.

Do doświadczeń używano szczurów dorosłych (4-miesięczne) i starych (24-miesięczne) rasy Wistar, z hodowli prowadzonej w IMDiK PAN, w Warszawie. Strukturę drugorzędową peptydów A $\beta$  oceniano metodą dichroizmu kołowego, a ich agregację (fibrylizację) na podstawie elektroforezy na żelu poliakrylamidowym oraz spektrofluorymetrycznie z użyciem tioflawiny-T. Wyjściowym materiałem do badań była istota szara kory mózgu, hipokamp oraz prążkowie. Aktywność badanych enzymów oznaczano w homogenacie, frakcji synaptoneurozomalnej i synaptozomalnej oraz we frakcjach subkomórkowych: błonach synaptoplazmatycznych i w cytozolu. W badaniach aktywności enzymów stosowano metody radiochemiczne. Ekspresję genu na poziomie białka oznaczano metodą immunochemiczną, natomiast na poziomie mRNA

przy użyciu techniki hybrydyzacji *in situ* i metody RT-PCR. Do badania poziomu wolnych rodników i oksydacji białek i lipidów używano metody spektrofluorymetryczne i spektrofotometryczne.

W badaniach stwierdzono, że aktywność ChAT jest obniżona w korze mózgu i prążkowie u zwierząt starych w stosunku do dorosłych. Zagregowane peptydy A $\beta$  powodują znamienne obniżenie aktywności ChAT wyłącznie w prążkowie starczym. Kwas arachidonowy (KA) i nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) powodują również obniżenie aktywności tego enzymu w prążkowie. Uzyskane wyniki wskazują, że A $\beta$  poprzez uwalnianie KA i wolnych rodników może wpływać na zaburzenie funkcji układu cholinergicznego prawdopodobnie na skutek większej wrażliwości starczego prążkowie na działanie tych związków.

Zaobserwowano, że wyłącznie zagregowany A $\beta$  1-40 oraz jego neurotoksyczny fragment A $\beta$  25-35 wywołują obniżenie aktywności PIP<sub>2</sub>-PLC (PLC $\beta$ ) podstawowej oraz zależnej od pobudzenia receptora cholinergicznego i białek G w korze mózgu i w hipokampie u zwierząt dorosłych. Wyniki wskazują, że zagregowane formy peptydów A $\beta$  w wyniku znaczącego obniżenia aktywności PLC $\beta$  degradującej PIP<sub>2</sub> i inhibicji uwalniania wtórnych metabolicznych przekaźników informacji takich jak DAG i IP<sub>3</sub> mogą być odpowiedzialne za zaburzenie transdukcji sygnału regulowanej przez wymienione mediatory.

Stwierdzono także, że pobudzenie receptora cholinergicznego wywołuje wzrost aktywności PARP w korze mózgu i w hipokampie u zwierząt dorosłych. Zablokowanie receptora dla IP<sub>3</sub> znosi obserwowaną aktywację tego enzymu. Wyniki wskazują, że PARP jest jądrowym odbiorcą sygnału przekazywanego od receptora cholinergicznego, a peptydy A $\beta$  znoszą aktywację enzymu zależną od pobudzenia tego receptora. Zagregowane peptydy A $\beta$  poprzez inhibicję zależnej od receptora PLC i obniżenie poziomu IP<sub>3</sub> mogą zaburzać przekazywanie informacji do jądra komórkowego na poziomie PARP-u.

Po raz pierwszy wykazano, że nie tylko zagregowany A $\beta$  1-40, ale również apoE4 obniża aktywność PI-PLC (PLC $\delta$ ) w korze mózgu i w hipokampie u zwierząt dorosłych. Ponadto stwierdzono, że apoE4 powoduje wzrost poziomu białka PLC $\delta$ . Wyniki te sugerują, że zarówno peptydy A $\beta$  jak i apoE4 w wyniku obniżenia

aktywności PLC $\delta$  i poziomu DAG mogą wpływać na degradację  $\beta$ APP w kierunku amyloidogennym.

Stwierdzono, że A $\beta$  1-42 wywołuje obniżenie fosforylacji PIP do PIP<sub>2</sub> w korze mózgu i w hipokampie u zwierząt dorosłych. A $\beta$  oraz apoE4 i KA odpowiednio hamują aktywność PI-4 kinazy oraz PI-4 kinazy i PIP-5kinazy w korze mózgu. Wyniki te sugerują, że peptydy A $\beta$  i apoE4 poprzez obniżenie poziomu PIP i PIP<sub>2</sub> mogą modulować funkcje cytoszkieletu komórki oraz aktywność PLC i zależne od niej procesy.

Zagregowane peptydy A $\beta$  stymulują napływ Ca<sup>2+</sup> do synaptosomów kory mózgu przez kanały zależne od potencjału typu L. Ponadto A $\beta$  1-40/1-42 stymuluje uwalnianie KA z PI oraz produkcję wolnych rodników i oksydację lipidów i białek błon synaptoplazmatycznych. Wyniki sugerują, że wyżej wymienione procesy stymulowane przez peptydy A $\beta$  indukują w cytozolu zakończeń synaptycznych (synaptosomach) procesy prowadzące do degradacji DNA jądrowego.



## IX PIŚMIENNICTWO

1. Allen JW, Eldadah BA, Huang X, Knoblach SM, Faden AI (2001) Multiple caspases are involved in beta-amyloid-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci Res.* 65 (1) 45-53.
2. Almeida T, Cunha RA, Ribeiro JA (1999) Facilitation by arachidonic acid of acetylcholine release from the rat hippocampus. *Brain Res.* 826 (1) 104-111.
3. Arispe N, Rojas E, Pollard HB (1993) Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90 (2) 567-571.
4. Asakwa T and Matsushita S (1980) Coloring Conditions of Thiobarbituric Acid Test for detecting Lipid Hydroperoxides *Lipids* 15 (3) 137-140.
5. Ashcroft FM. (1998) Exciting times for PIP2 *Science* 282 1059-1060
6. Atwood CS, Scarpa RC, Huang X, Moir RD, Jones WD, Fairlie DP, Tanzi RE, Bush AI (2000) Characterization of copper interactions with alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta1-42. *J Neurochem.* 75 (3) 1219-1233.
7. Auld DS, Kar S, Quirion R (1998) Beta-amyloid peptides as direct cholinergic neuromodulators: a missing link?. *Trends Neurosci.* 21 (1) 43-49.
8. Bae YS, Cantley LG, Chen CS, Kim SR, Kwon KS, Rhee SG (1998) Activation of phospholipase C-gamma by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* 273 (8) 4465-4469.
9. Barańska J (1992) *Rozpad Fosfolipidów a Przekazywanie Informacji w Komórce.* (Biuletyn Polskiego Towarzystwa Biochemicznego)
10. Bartus RT, Dean RL, Pontecorvo MJ, Flicker C (1985) The cholinergic hypothesis: a historical overview, current perspective, and future directions. *Ann N Y Acad Sci.* 444 332-358
11. Baxter MG, Frick KM, Price DL, Breckler SJ, Markowska AL, Gorman LK (1999) Presynaptic markers of cholinergic function in the rat brain: relationship with age and cognitive status. *Neuroscience* 89 (3) 771-779.
12. Begley JG, Duan W, Chan S, Duff K, Mattson MP (1999) Altered calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in cortical synaptic compartments of presenilin-1 mutant mice. *J Neurochem.* 72 (3) 1030-1039.
13. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77 (6) 817-827.

14. Berridge MJ, Irvine RF (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 22-28 (312) 315-321.
15. Berridge MJ (1993) Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature* 365 388-389.
16. Bird TD, Stranahan S, Sumi SM, Raskind M. (1983) Alzheimer's disease: choline acetyltransferase activity in brain tissue from clinical and pathological subgroups. *Ann Neurol.* 14 (3) 284-293.
17. Birnbaumer L, Boulay G, Brown D, Jiang M, Dietrich A, Mikoshiba K, Zhu X, Qin N (2000) IP<sub>3</sub> receptor and TRP links the internal calcium storage compartment to plasma membrane CCE channels. *Recent Prog Horm Res.* 55 127-161.
18. Blakemore C (2001) The genetic basis of neuronal plasticity. *Acta Neurobiol Exp. (Warsz)* 61 (3) 221 (Plenary Lecture, Session 24).
19. Bligh EG and Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 37 911-917.
20. Boissire F, Faucheux B, Agid Y, Hirsch EC (1997) Choline acetyltransferase mRNA expression in the striatal neurons of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 225 (3) 169-172.
21. Boksa P, Mykita S, Collier B (1988) Arachidonic acid inhibits choline uptake and depletes acetylcholine content in rat cerebral cortical synaptosomes. *J Neurochem.* 50 (4) 1309-1318.
22. Borlongan CV, Stahl CE, Keep MF, Elmer E, Watanabe S (2000) Cyclosporine-A enhances choline acetyltransferase immunoreactivity in the septal region of adult rats. *Neurosci Lett.* 279 (2) 73-76.
23. Bothmer J, Jolles J (1994) Phosphoinositide metabolism, aging and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1225 (2) 111-124.
24. Bothmer J, Markerink M, Jolles J (1994a) Phosphoinositide kinase activities in synaptosomes prepared from brains of patients with Alzheimer's disease and controls. *Neurosci Lett.* 176 (2) 169-172.
25. Bothmer J, Markerink M, Jolles J (1994b) Evidence for a selective decrease in type 1 phosphatidylinositol kinase activity in brains of patients with Alzheimer's disease. *Dementia.* 5 (1) 6-11.
26. Bothmer J, Markerink M, Jolles J (1992) Brain phosphatidic acid and polyphosphoinositide formation in a broken cell preparation: regional distribution and the effect of age. *Neurochem Int.* 21 (2) 223-228.

27. Bray GA (1960) A rapid efficient liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1 279-285.
28. Bruce G, Hersh LB (1989) The phosphorylation of choline acetyltransferase. *Neurochem Res.* 14 (7) 613-620.
29. Butler AJ, Ordahl CP (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol.* 19 (1) 296-306.
30. Butterfield DA, Hensley K, Harris M, Mattson M, Carney (1994) beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *J. Biochem Biophys Res Commun.* 200 (2) 710-715.
31. Butterfield DA, Howard B, Yatin S, Koppal T, Drake J, Hensley K, Aksenov M, Aksenova M, Subramaniam R, Varadarajan S, Harris-White ME, Pedigo NW, Carney JM (1999) Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease. *Life Sci.* 65 (18-19) 1883-1892.
32. Butterfield DA, Kanski J (2002) Methionine residue 35 is critical for the oxidative stress and neurotoxic properties of Alzheimer's amyloid beta-peptide 1-42. *Peptides* 23 (7) 1299-1309.
33. Butterfield DA, Lauderback CM (2002) Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 32 (11) 1050-1060.
34. Buxbaum JD, Oishi M, Chen HI, Pinkas\_Kramarski R, Jaffe EA, Gandy SE, Greengard P (1992) Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 (21) 10075-10078.
35. Camps M, Carozzi A, Schnabel P, Scheer A, Parker PJ, Gierschik P (1992) Isozyme-selective stimulation of phospholipase C $\beta$ 2 by G protein  $\beta\gamma$ -subunits. *Nature* 360 (6405) 684-686.
36. Carpenter CL, Cantley LC (1996) Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol.* 8 (2) 153-158.
37. Carricaburu V, Fournier B (2001) Phosphoinositide fatty acids regulate phosphatidylinositol 5-kinase, phospholipase C and protein kinase C activities. *Eur J Biochem.* 268 (5) 1238-1249.
38. Cedazo-Minguez A, Cowburn RF (2001) Apolipoprotein E isoform-specific disruption of phosphoinositide hydrolysis: protection by estrogen and glutathione. *FEBS Lett.* 504 (1-2) 45-49.

39. Cedazo-Minguez A, Wiehager B, Winblad B, Huttinger M, Cowburn RF (2001) Effects of apolipoprotein E (apoE) isoforms, beta-amyloid (A $\beta$ ) and apoE/A $\beta$  complexes on protein kinase C-alpha (PKC- $\alpha$ ) translocation and amyloid precursor protein (APP) processing in human SH-SY5Y neuroblastoma cells and fibroblasts. *Neurochem Int.* 38 (7) 615-625.
40. Chang WJ, Alvarez-Gonzalez R (2001) The sequence-specific DNA binding of NF-kappa B is reversibly regulated by the automodification reaction of poly (ADP-ribose) polymerase 1. *J Biol Chem.* 276 (50) 47664-47670.
41. Cheng B, Christakos S, Mattson MP (1994) Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 12 139-153.
42. Cheng B, Mattson MP (1991) NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis. 7 1031-1041.
43. Chi TH, Crabtree GR. (2000) Perspectives: signal transduction. Inositol phosphates in the nucleus. *Science* 287 (5460) 1937-1939.
44. Choi WC, Gerfen CR, Suh PG, Rhee SG (1989) Immunohistochemical localization of a brain isozyme of phospholipase C (PLC III) in astroglia in rat brain. *Brain Res.* 499 (1) 193-197.
45. Collerton D (1986) Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 19 (1) 1-28.
46. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162 (1) 156-159.
47. Corvera S, D'Arrigo A, Stenmark H. (1999) Phosphoinositides in membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol Review.* 11 (4) 460-465
48. Cremona O and De Camilli P (2001) Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *Journal of Cell Science* 114 1041-1052.
49. Crews FT, Kurian P, Freund G (1994) Cholinergic and serotonergic stimulation of phosphoinositide hydrolysis is decreased in Alzheimer's disease. *Life Sci.* 55 1993-2002.
50. Davidson RM, Shajenko L, Donta TS (1994) Amyloid beta-peptide (A beta P) potentiates a nimodipine-sensitive L-type barium conductance in N1E-115 neuroblastoma cells. *Brain Res.* 643 (1-2) 324-327.
51. de Graaf P, Klapisz EE, Schulz TK, Cremers AF, Verkleij AJ, van Bergen En Henegouwen PM. (2002) Nuclear localization of phosphatidylinositol 4-kinase  $\beta$ . *J Cell Sci.* 115 (Pt 8) 1769-1775.

52. Diana A, Eriksson C, Winblad B, Schultzberg M (2000) IL-1beta and ICE mRNA are not altered upon A $\beta$  (25-35) induced neurotoxicity in human neuroblastoma cells. *Int J Dev Neurosci.* 18 (2-3) 237-246.
53. Dickson DW (1997) The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56 (4) 321-339.
54. Ditaranto K, Tekirian TL, Yang AJ (2001) Lysosomal Membrane Damage in Soluble amyloid beta-Mediated Cell Death in Alzheimer's Disease *Neurobiol. of Dis.* 8 19-31.
55. Dournaud P, Gautron JP, Pattou E, Bons N, Mestre N, Petter A, Kordon C, Epelbaum J (1994) Choline acetyltransferase and somatostatin levels in aged *Microcebus murinus* brain. *Neurobiol Aging.* 15 (6) 727-731.
56. Estus S, Golde TE, Kunishita T, Blades D, Lowery D, Eisen M, Usiak M, Qu XM, Tabira T, Greenberg BD (1992) Potentially amyloidogenic, carboxyl-terminal derivatives of the amyloid protein precursor. *Science* 255 (5045) 726-728.
57. Exton JH (1996) Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 36 481-509.
58. Falasca M, Logan SK, Lehto VP, Baccante G, Lemmon MA, Schlessinger J (1998) Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J.* 17 (2) 414-422.
59. Ferrari-DiLeo G, Flynn DD (1993) Diminished muscarinic receptor-stimulated [ $^3$ H]-PIP $_2$  hydrolysis in Alzheimer's disease. *Life Sci.* 53 (25) PL 439-444.
60. Fisher SK, Heacock AM, Agranoff BW (1992) Inositol lipids and signal transduction in the nervous system. An update. *J Neurochem.* 58 (1) 18-38.
61. Fonnum F (1975) A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J Neurochem.* 24 (2) 407-409.
62. Forloni G, Chiesa R, Smiroldo S, Verga L, Salmona M, Tagliavini F, Angeretti N (1993) Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment. *Neuroreport* 25-35 5523-5526.
63. Frautschy SA, Baird A, Cole GM (1991) Effects of injected Alzheimer beta-amyloid cores in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (19) 8362-8366.
64. Fujii S, Matsumoto M, Igarashi K, Kato H, Mikoshiba K (2000) Synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons of mice lacking type 1 inositol-1,4,5-trisphosphate receptors. *Learn Mem.* 7 (5) 312-320.

65. Fukami K, Nakao K, Inoue T, Kataoka Y, Kurokawa M, Fissore RA, Nakamura K, Katsuki M, Mikoshiba K, Yoshida N, Takenawa T (2001) Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science* 292 (5518) 920-923.
66. Fukuyama H, Ogawa M, Yamauchi H, Yamaguchi S, Kimura J, Yonekura Y, Konishi J (1994) Altered cerebral energy metabolism in Alzheimer's disease: a PET study. *J Nucl Med.* 35 (1) 1-6.
67. Geula C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M., Yankner BA (1998) Aging renders the brain vulnerable to amyloid  $\beta$  protein neurotoxicity. *Nature Med.* 4 (7) 827-831.
68. Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commu.* 120 (3) 885-890.
69. Golde TE, Estus S, Younkin LH, Selkoe DJ, Younkin SG (1992) Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* 255 (5045) 728-730.
70. Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ (1992a) Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357 (6378) 500-503.
71. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo\_Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB (1992b) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359 (6393) 322-325.
72. Haniu M, Denis P, Young Y, Mendiaz EA, Fuller J, Hui JO, Bennett BD, Kahn S, Ross S, Burgess T, Katta V, Rogers G, Vassar R, Citron M (2000) Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J Biol Chem.* 275 (28) 21099-21106.
73. Hannan AJ, Blakemore C, Katsnelson A, Vitalis T, Huber KM, Bear M, Roder J, Kim D, Shin HS, Kind PC (2001) PLC-beta1, activated via mGluRs, mediates activity-dependent differentiation in cerebral cortex. *Nat Neurosci.* 4 (3) 282-288.
74. Harkany T, Mulder J, Sasvári M, Abrahám I, Kónya C, Zarándi M, Penke B, Luiten PG, Nyakas C (1999) N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 and radical scavengers protect cholinergic nucleus basalis neurons against beta-amyloid neurotoxicity. *Neurobiol Dis.* 6 (2) 109-121.
75. Hartmann H, Eckert A, Crews T and Müller E (1996)  $\beta$ -Amyloid amplifies PLC activity and  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in fully differentiated brain cells of adult mice. *Int. J. Exp. Clin. Invest.* 3 234-241.

76. Hassa PO, Covic M, Hasan S, Imhof R, Hottiger MO (2001) The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NFκB coactivator function. *J Biol Chem.* 276 (49) 45588-45597.
77. Hassa PO, Hottiger MO (1999) A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NFκB transcriptional activation. *Biol Chem.* 380 (7-8) 953-959.
78. Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA (1994) A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91 (8) 3270-3274.
79. Hiramatsu M, Edamatsu R, Mori A (1992) Free radicals, lipid peroxidation, SOD activity, neurotransmitters and choline acetyltransferase activity in the aged rat brain. *EXS.* 62 213-218.
80. Hokin LE and Hokin MR (1953) Enzyme secretion and the incorporation of <sup>32</sup>P into phospholipides of pancreas slices. *J. Biol. Chem.* 203 967-977.
81. Hollingsworth EB, McNeal ET, Burton JL, Williams RJ, Daly JW, Creveling CR (1985) Biochemical characterization of a filtered synaptoneurosome preparation from guinea pig cerebral cortex: cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-generating systems, receptors, and enzymes. *J Neurosci.* 5 2240-2253.
82. Hölscher C (1998) Possible causes of Alzheimer's disease: amyloid fragments, free radicals, and calcium homeostasis. *Neurobiol Dis.* 5 (3) 129-141.
83. Homburg S, Visochek L, Moran N, Dantzer F, Priel E, Asculai E, Schwartz D, Rotter V, Dekel N, Cohen-Armon M. (2000) A fast signal-induced activation of Poly(ADP-ribose) polymerase: a novel downstream target of phospholipase c *J Cell Biol.* 150 (2) 293-307.
84. Hoshi, M., Takashima, A., Muryama, M., Yasutake, K., Yoshida, N., Ishiguro, K., Hoshino, T. and Imahori K. (1997) Nontoxic Aβ1-42 suppresses acetylcholine synthesis. *J.Biol Chem.* 272 2038-2041.
85. Howlett DR, Jennings KH, Lee DC, Clark MS, Brown F, Wetzel R, Wood SJ, Camilleri P, Roberts GW (1995) Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. *Neurodegeneration* 4 (1) 23-32.
86. Hsu AL, Ching TT, Sen G, Wang DS, Bondada S, Authi KS, Chen CS (2000) Novel function of phosphoinositide 3-kinase in T cell Ca<sup>2+</sup> signaling. A phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-mediated Ca<sup>2+</sup> entry mechanism. *J Biol Chem.* 275 (21) 16242-16250.
87. Huang HM, Ou HC, Hsieh SJ (2000) Amyloid beta peptide impaired carbachol but not glutamate-mediated phosphoinositide pathways in cultured rat cortical neurons. *Neurochem Res.* 25 303-312.

88. Huang X, Cuajungco MP, Atwood CS, Hartshorn MA, Tyndall JD, Hanson GR, Stokes KC, Leopold M, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Saunders AJ, Lim J, Moir RD, Glabe C, Bowden EF, Masters CL, Fairlie DP, Tanzi RE, Bush AI (1999) Cu (II) potentiation of alzheimer A $\beta$  neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J Biol Chem.* 274 (52) 37111-37116.
89. Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as  $\beta$ -secretase. *Mol Cell Neurosci.* 14 (6) 419-427.
90. Hwang SC, Jhon DY, Bae YS, Kim JH, Rhee SG (1996) Activation of phospholipase C $\gamma$  by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J Biol Chem.* 271 (31) 18342-18349.
91. Issa AM, Gauthier S, Collier B (1996) Effects of the phosphatase inhibitors calyculin A and okadaic acid on acetylcholine synthesis and content of rat hippocampal formation. *J Neurochem.* 66 (5) 1924-1932.
92. Jeggo PA (1998) DNA repair: PARP-another guardian angel? *Current Biology*, 8 R49-R51.
93. Jenco JM, Becker KP, Morris AJ (1997) Membrane-binding properties of phospholipase C-beta1 and phospholipase C-beta2: role of the C-terminus and effects of polyphosphoinositides, G-proteins and Ca<sup>2+</sup>. *Biochem J.* 15 (327) (Pt 2): 431-437.
94. Jolles J, Bothmer J, Markerink M, Ravid R (1993) Reduced phosphatidylinositol kinase activity in Alzheimer's disease: effects of age and onset. *Dementia* 2 81-86.
95. Jolles J, Bothmer J, Markerink M, Ravid R (1992) Phosphatidylinositol kinase is reduced in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 6 2326-2329.
96. Jope R.S (1996) Cholinergic muscarinic receptor signaling by the phosphoinositide signal transduction system in Alzheimer's disease *Alzheimer's Disease review.* 1 2-14.
97. Jope RS, Song L, Powers RE (1997) Cholinergic activation of phosphoinositide signaling is impaired in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging.* 18 (1) 111-120.
98. Kannan P, Yu Y, Wankhade S, Tainsky MA (1999) PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res.* 27 (3) 866-874.
99. Kar, S., Issa, A.M., Seto, D., Auld, D.S., Collier, B. and Quirion R. (1998) Amyloid  $\beta$ -peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* 70 2179-2187.



100. Katsuki H, Okuda S (1995) Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. *Prog Neurobiol.* 46 (6) 607-636.
101. Keller JN, Pang Z, Geddes JW, Begley JG, Germeyer A, Waeg G, Mattson MP (1997) Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem.* 69 (1) 273-284.
102. Kelly JF, Furukawa K, Barger SW, Rengen MR, Mark RJ, Blanc EM, Roth GS, Mattson MP (1996) Amyloid beta-peptide disrupts carbachol-induced muscarinic cholinergic signal transduction in cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93 (13) 6753-6758.
103. Kienlen-Campard P, Miolet S, Tasiaux B, Octave JN (2002) Intracellular A $\beta$  1-42, but Not Extracellular Soluble A $\beta$  Peptides, Induces Neuronal Apoptosis. *J Biol Chem.* 277 (18) 15666-15670.
104. Kim MJ, Min DS, Ryu SH, Suh PG (1998) A cytosolic,  $\alpha$ q- and  $\beta/\gamma$ -insensitive splice variant of phospholipase C- $\beta$ 4. *J Biol Chem.* 273 (6) 3618-3624.
105. Kind PC, Kelly GM, Fryer HJ, Blakemore C, Hockfield S (1997) Phospholipase C- $\beta$ 1 is present in the botrysome, an intermediate compartment-like organelle, and is regulated by visual experience in cat visual cortex. *J Neurosci.* 17 (4) 1471-480.
106. Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA (1991) An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (16) 7247-7251.
107. Koyanagi M, Ono K, Suga H, Iwabe N, Miyata T (1998) Phospholipase C cDNAs from sponge and hydra: antiquity of genes involved in the inositol phospholipid signaling pathway. *FEBS Lett.* 439 (1-2) 66-70.
108. Kristofikov Z, Klaschka J, Tejkalov H (1998) Effects of K<sup>+</sup>-depolarization, arachidonic acid, ethanol, and aging on the high-affinity choline transport in rat hippocampus. *Neurochem Res.* 23 (7) 923-929.
109. Lee CW, Lee KH, Lee SB, Park D, Rhee SG (1994) Regulation of phospholipase C-beta 4 by ribonucleotides and the alpha subunit of Gq. *J Biol Chem.* 269 (41) 25335-25338.
110. Lee JM, Hanson JM, Chu WA, Johnson JA (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 276 (23) 20011-20016.
111. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent J, Lenz A.G, Ahn B, W, Shaltiel S, Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* 186 464-478.

112. Liu M, Simon MI (1996) Regulation by cAMP-dependent protein kinase of a G-protein-mediated phospholipase C. *Nature* 382 6586 83-87.
113. Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW (1993) Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 17 7951-7955
114. Lopez I, Mak EC, Ding J, Hamm HE, and Lomasney JW. (2001) A Novel Bifunctional Phospholipase C That Is Regulated by  $G\alpha_{12}$  and Stimulates the Ras/Mitogen-activated Protein Kinase Pathway *J.Biol.Chem.* 276: 2758-2765.
115. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 265-275.
116. Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W, Huang XY (2000) Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* 102 (5) 635-646.
117. MacManus A, Ramsden M, Murray M, Henderson Z, Pearson HA, Campbell VA (2000) Enhancement of  $[^{45}]\text{Ca}^{2+}$  influx and voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity by A $\beta$  1-40 in rat cortical synaptosomes and cultured cortical neurons. Modulation by the proinflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$ . *J Biol Chem.* 275 (7) 4713-4718.
118. Marchbanks RM (1982) Biochemistry of Alzheimer's dementia. *J Neurochem.* 39 (1) 9-15.
119. Mark RJ, Hensley K, Butterfield DA, Mattson MP (1995) Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and cell death. *J Neurosci.* 15 (90) 6239-6249.
120. Mark RJ, Blanc EM, Mattson MP (1996) Amyloid beta-peptide and oxidative cellular injury in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 12 (3) 211-224.
121. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82 (12) 4245-4249.
122. Mattson MP (2000) Apoptotic and anti-apoptotic synaptic signaling mechanisms. *Brain Pathol.* 10 (2) 300-312.
123. Mattson MP, Barger SW, Cheng B, Lieberburg I, Smith\_Swintosky VL, Rydel RE (1993a) beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 16 (10) 409-414.
124. Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE (1992)  $\beta$ -Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci.* 12 (2) 376-389.

125. Mattson MP, Murrain M, Guthrie PB, Kater SB (1989) Fibroblast growth factor and glutamate: opposing roles in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *J Neurosci.* 9 3728-3740.
126. Mattson MP, Tomaselli KJ, Rydel RE (1993b) Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated beta-amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain Res.* 621 (1) 35-49.
127. Mattson MP, Partin J, Begley JG (1998) Amyloid beta-peptide induces apoptosis-related events in synapses and dendrites. *Brain Res.* 807 (1-2) 167-176.
128. Meves H (1994) Modulation of ion channels by arachidonic acid. *Prog Neurobiol.* 43 (20) 175-186.
129. Michell RH (1975) Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim Biophys Acta* 415 (1) 81-87.
130. Mikoshiba K (2001) IP<sub>3</sub> Receptor/Ca<sup>2+</sup> Channel: a Key Molecule in Development and Neural Plasticity. *Proc. Aust. Neuroscience Soc.* 12 (Plenary 5).
131. Milton NG (1999) Amyloid-beta binds catalase with high affinity and inhibits hydrogen peroxide breakdown. *Biochem J.* 1 (344) Pt 2 293-296.
132. Miranda S, Opazo C, Larrondo LF, Munoz FJ, Ruiz F, Leighton F, Inestrosa NC (2000) The role of oxidative stress in the toxicity induced by A $\beta$ -peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 62 (6) 633-648.
133. Mizuguchi M, Yamada M, Kim SU, Rhee SG (1991) Phospholipase C isozymes in neurons and glial cells in culture: an immunocytochemical and immunochemical study. *Brain Res.* 548 (1-2) 35-40.
134. Morris AJ, Scarlata S (1997) Regulation of effectors by G-protein alpha- and beta gamma-subunits. Recent insights from studies of the phospholipase c-beta isoenzymes. *Biochem Pharmacol.* 54 (4) 429-435.
135. Murthy SN, Lomasney JW, Mak EC, Lorand L (1999) Interactions of G(h)/transglutaminase with phospholipase Cdelta1 and with GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (96) 21 11815-11819.
136. Nagele RG, D'Andrea MR, Anderson WJ, Wang HY. (2002) Intracellular accumulation of A $\beta$  1-42 in neurons is facilitated by the  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease *Neuroscience.* 110 (2) 199-211.
137. Neve RL, Finch EA, Dawes LR (1988) Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron* 1 (8) 669-677.
138. Ninomiya Y, Kayama Y (1998) Inhibition of Choline Acetyltransferase Activity by Serum Albumin Modified with Octanoic Acid and Other Fatty Acids. *Neurochem. Res.* 23 (10) 1303-1311.

139. Nishiyama M, Hong K, Mikoshiba K, Poo MM, Kato K (2000) Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* (408) 6812 584-588.
140. Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258 304-307.
141. Noh DY, Shin SH, Rhee SG (1995) Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim Biophys Acta.* 1242 (2) 99-113.
142. Octave JN (1995) The amyloid peptide and its precursor in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci.* 6 287-316.
143. Odom AR, Stahlberg A, Wenthe SR, York JD (2000) A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science* 287 (5460) 2026-2029.
144. Ogawa N, Asanuma M, Kondo Y, Nishibayashi S, Mori A (1994) Reduced choline acetyltransferase activity and muscarinic M1 receptor levels in aged Fisher 344 rat brains did not parallel their respective mRNA levels. *Brain Res.* 658 (1-2) 87-92.
145. Olsson H, Martinez-Arias W, Drobak BK, Jergil B (1999) Presence of a novel form of phosphatidylinositol 4-kinase in rat liver. *FEBS Lett.* 361 (2-3) 282-286.
146. Osborne SL, Meunier FA, Schiavo G. (2001) Phosphoinositides as key regulators of synaptic function *Neuron Review.* 32 (1) 9-12.
147. Pacheco MA, Jope RS (1996) Phosphoinositide signaling in human brain. *Prog Neurobiol.* 50 (2-3) 255-273.
148. Palmer AM, Gershon S (1990) Is the neuronal basis of Alzheimer's disease cholinergic or glutamatergic? *FASEB J.* 4 (10) 2745-2752.
149. Pan ZK, Christiansen SC, Ptasznik A, Zuraw BL (1999) Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activity for bradykinin stimulation of NF-kappaB activation in cultured human epithelial cells. *J Biol Chem.* 274 (15) 9918-9922.
150. Park D, Jhon DY, Lee CW, Lee KH, Rhee SG (1993) Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *J Biol Chem.* 268 (7) 4573-4576.
151. Parks JK, Smith TS, Trimmer PA, Bennett JP i Parker WD (2001) Neurotoxic A $\beta$  peptides increase oxidative stress *in vivo* through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition *in vitro*. *J Neurochem.* 76 1050-1056.

152. Pastorino L, Ikin AF, Nairn AC, Pursnani A, Buxbaum JD. (2002) The carboxyl-terminus of BACE contains a sorting signal that regulates BACE trafficking but not the formation of total A $\beta$ . *Mol Cell Neurosci.* 19 (2) 175-185.
153. Payrastre B, Missy K, Giuriato S, Bodin S, Plantavid M, Gratacap M. (2001) Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space *Cell Signal Review.* 13 (6) 377-387.
154. Pedersen WA, Guo Q, Hartman BK, Mattson MP (1997) Nerve growth factor-independent reduction in choline acetyltransferase activity in PC12 cells expressing mutant presenilin-1. *J Biol Chem.* 272 (36) 22397-22400.
155. Pedersen WA, Kloczewiak MA, Blusztajn JK (1996) Amyloid beta-protein reduces acetylcholine synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (15) 8068-8071.
156. Pedersen, W.A. and Blusztajn, J.K. (1997) Characterization of the acetylcholine-reducing effect of the amyloid- $\beta$  peptide in mouse SN56 cells. *Neurosci.Lett.* 239 77-80.
157. Perry EK (1986) The cholinergic hypothesis--ten years on. *Br Med Bull.* 42 (1) 63-69.
158. Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1991) In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* 563 (1-2) 311-314.
159. Pike LJ (1992) Phosphatidylinositol 4-kinases and the role of polyphosphoinositides in cellular regulation. *Endocr Rev.* 13 (4) 692-706.
160. Pillot T, Goethals M, Vanloo B, Talussot C, Brasseur R, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Lins L (1996) Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *J Biol Chem.* 271 (46) 28757-28765.
161. Pieper AA, Blackshaw S, Clements EE, Brat DJ, Krug DK, White AJ, Pinto\_Garcia P, Favit A, Conover JR, Snyder SH, Verma A (2000) Poly(ADP-ribosylation) basally activated by DNA strand breaks reflects glutamate-nitric oxide neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97 (4) 1845-1850.
162. Ptasznik A, Beattie GM, Mally MI, Cirulli V, Lopez A, Hayek A (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase is a negative regulator of cellular differentiation. *J Cell Biol.* 137 (5) 1127-1136.
163. Price SA, Held B, Pearson HA (1998) Amyloid beta protein increases Ca<sup>2+</sup> currents in rat cerebellar granule neurones. *Neuroreport.* 9 (3) 539-545.
164. Ptasznik A, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM (1995) G protein-coupled chemoattractant receptors regulate Lyn tyrosine kinase Shc adapter protein signalling complexes. *J. Biol. Chem.* 270 19969-19973.

165. Ptasznik A, Giewirtz AM (2000) Cross-talk between protein-coupled receptors and tyrosine kinase signalling. *Arch. Immun. Ther. Exp.* 48 27-30.
166. Rebecchi MJ, Pentyala SN (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev.* 80 (4) 1291-1335.
167. Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem.* 70 281-312.
168. Rhee SG, Choi KD (1992) Multiple forms of phospholipase C isozymes and their activation mechanisms. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 26 35-61.
169. Rhee SG, Ryu SH, Lee KY, Cho KS (1991) Assays of phosphoinositide-specific phospholipase C and purification of isozymes from bovine brains. *Methods Enzymol.* 197 502-511.
170. Richter JA, Perry EK, Tomlinson BE (1980) Acetylcholine and choline levels in post-mortem human brain tissue: preliminary observations in Alzheimer's disease. *Life Sci.* 26 (20) 1683-1689.
171. Ross CA, MacCumber MW, Glatt CE, Snyder SH (1989) Brain phospholipase C isozymes: differential mRNA localizations by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86 (8) 2923-2927.
172. Roustan P, Abitbol M, Menini C, Ribeau deau F, Gerard M, Vekemans M, Mallet J, Dufier JL (1995) The rat phospholipase C beta 4 gene is expressed at high abundance in cerebellar Purkinje cells. *Neuroreport.* 6 (14) 1837-1841.
173. Rylett RJ, Ball MJ, Colhoun EH (1983) Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res.* 289 (1-2) 169-175.
174. Samochocki M., Łałowski MM, Strosznajder JB (1998) Amyloid  $\beta$  25-35 peptide enhances  $Ca^{2+}$  influx into cerebrocortical synaptoneuroosomes exclusively through L-type channel. *Neurobiol Aging.* 19 (4S) 200.
175. Saiardi A, Nagata E, Luo HR, Snowman AM, Snyder SH (2000) Identification and characterization of a novel inositol hexakisphosphate kinase. *J Biol Chem.* 276 (42) 39179-39185.
176. Schagger H and von Jgow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166 368-379.
177. Sekiya F, Bae YS, Jhon DY, Hwang SC, Rhee SG (1999) AHNAK, a protein that binds and activates phospholipase C- $\gamma$ 1 in the presence of arachidonic acid. *J Biol Chem.* 274 (20) 13900-13907.

178. Shimohama S, Fujimoto S, Matsushima H, Takenawa T, Taniguchi T, Perry G, Whitehouse PJ, Kimura J (1995) Alteration of phospholipase C- $\delta$  protein level and specific activity in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 64 (6) 2629-2634.
179. Shimohama S, Sasaki Y, Fujimoto S, Kamiya S, Taniguchi T, Takenawa T, Kimura J (1998) Phospholipase C isozymes in the human brain and their changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 82 (4) 999-1007.
180. Simonsen A, Wurmser AE, Emr SD, Stenmark H. (2001) The role of phosphoinositides in membrane transport *Curr Opin Cell Biol Review.* 13 (4) 485-492.
181. Singer WD, Brown HA, Jiang X, Sternweis PC (1996) Regulation of phospholipase D by protein kinase C is synergistic with ADP-ribosylation factor and independent of protein kinase activity. *J Biol Chem.* 271 (8) 4504-4510.
182. Singh IN, McCartney DG, Kanfer JN (1995) A $\beta$  25-35 stimulation of phospholipases A, C and D activities of LA-N-2 cells. *FEBS Lett.* 365 (2-3) 125-128.
183. Singh IN, Sorrentino G, Kanfer JN (1997) A $\beta$  25-35 stimulation of phospholipase C in LA-N-2 cells. *J Neurochem.* 69 (1) 252-258.
184. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, John V (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein  $\beta$ -secretase from human brain. *Nature* 402 (6761) 537-540.
185. Sisodia SS (1992) Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 89 (13) 6075-6079.
186. Smith DO (1990) Acetylcholine synthesis and release in the extensor digitorum longus muscle of mature and aged rats. *J Neurochem.* 54 (4) 1433-1439.
187. Soininen H, Kosunen O, Helisalml S, Mannermaa A, Paljarvi L, Talasniemi S, Ryyananen M, Riekkinen P (1995) A severe loss of choline acetyltransferase in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying apolipoprotein  $\epsilon$ 4 allele. *Neurosci Lett.* 187 (2) 79-82.
188. Song Ch, Hu Ch, Masago M, Kariya K, Yamawaki-Kataoka Y, Shibatohe M, Wu D, Satoh T, and Kataoka T (2001) Regulation of a Novel Human Phospholipase C, PLC $\epsilon$ , through Membrane Targeting by Ras *J.Biol.Chem.* 276 2752-2757.
189. Soto C, Gołabek A, Wiśniewski T, Castano EM (1996) Alzheimer's beta-amyloid peptide is conformationally modified by apolipoprotein E in vitro. *Neuroreport* 7 (3) 721-725.

190. Stokes CE, Hawthorne JN (1987) Reduced phosphoinositide concentrations in anterior temporal cortex of Alzheimer-diseased brains. *J Neurochem.* 48 (4) 1018-1021.
191. Stokes CE, Gillon KR, Hawthorne JN (1983) Free and total lipid myo-inositol concentrations decrease with age in human brain. *Biochim Biophys Acta.* 753 (1) 136-138.
192. Strosznajder J, Samochocki M (1991)  $Ca^{2+}$ -independent,  $Ca^{2+}$ -dependent, and carbachol-mediated arachidonic acid release from rat brain cortex membrane. *J Neurochem.* 57 (4) 1198-206.
193. Strosznajder RP i Banasik M. (2000). Amyloid beta protein affects poly(ADP-ribose)polymerase activity in PC-12 cells in culture. *Acta Neurobiol. Exp.* 60 215.
194. Strosznajder JB, Jeśko H, Strosznajder RP (2000) Effect of amyloid bet peptide on poly(ADP-ribose)polymerase activity in adult and aged rat hippocampus. *Acta Biochim. Pol.* 47 847-854.
195. JB Strosznajder, A Zambrzycka, MD Kacprzak (1999) Amyloid beta peptide (25-35) modulates hydrolysis of phosphoinositides by membrane phospholipase(s) C of adult brain cortex. *J. Mol. Neurosci.* 12 101-109.
196. Sugiyama T, Matsuda Y, Mikoshiba K (2000) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor associated with focal contact cytoskeletal proteins. *FEBS Lett.* 466 (1) 29-34.
197. Suh PG, Ryu SH, Moon KH, Suh HW, Rhee SG (1988) Inositol phospholipid-specific phospholipase C: complete cDNA and protein sequences and sequence homology to tyrosine kinase-related oncogene products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85 (15) 5419-5423.
198. Tanaka O, Kondo H (1994) Localization of mRNAs for three novel members (beta 3, beta 4 and gamma 2) of phospholipase C family in mature rat brain. *Neurosci Lett.* 182 (1) 17-20.
199. Toker A, Cantley CL (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387 (6634) 673-676.
200. Tolar M, Keller JN, Chan S, Mattson MP, Marques MA, Crutcher KA (1999) Truncated apolipoprotein E (ApoE) causes increased intracellular calcium and may mediate ApoE neurotoxicity. *J Neurosci.* 19 (16) 7100-7110.
201. Ueda K, Shinohara S, Yagami T, Asakura K, Kawasaki K (1997) Amyloid beta protein potentiates  $Ca^{2+}$  influx through L-type voltage-sensitive  $Ca^{2+}$  channels: a possible involvement of free radicals. *J Neurochem.* 68 (1) 265-271.
202. Van Dongen CJ, Hershkowitz M., Zwiers H, De Latt S, Gipsen WH (1983) Lipid fluidity and phosphoinositide metabolism in brain membranes of aged rats:



- Effects of ACTH(1-24). In *Aging of the brain* (Gispén WH and Traber J), 101-104. Elsevier Amsterdam, The Netherlands.
203. Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, Butterfield DA (2001) Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A $\beta$  1-42 and A $\beta$  25-35. *J Am Chem Soc.* 123 (24) 5625-5631.
204. Varadarajan S, Yatin S, Kanski J, Jahanshahi F, Butterfield DA (1999) Methionine residue 35 is important in amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Brain Res Bull.* 50 (2) 133-141.
205. 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.
206. Vento R, Alessandro N, Giuliano M, Lauricella M, Carabillo M, Tesoriere G (2000) Induction of apoptosis by arachidonic acid in human retinoblastoma Y79 cells: involvement of oxidative stress. *Exp Eye Res.* 70 (4) 503-517.
207. Virag L, Scott GS, Antal-Szalmas P, O'Connor M., Ohshima H, Szabo C (1999) Requirement of intracellular calcium mobilization for peroxynitrite-induced poly(ADP-ribose)synthetase activation and cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* 56 (4) 824-833.
208. Virchow R (1851) Über eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundenene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose. Virchow-Reinherdt. *Arch Path Anat.* 6 135-138.
209. Wallace MA (1994) Effects of Alzheimer's disease-related beta amyloid protein fragments on enzymes metabolizing phosphoinositides in brain. *Biochim Biophys Acta.* 1227 (3) 183-187.
210. Wang Y, Chen J, Wang Y, Taylor CW, Hirata Y, Hagiwara H, Mikoshiba K, Toyooka T, Omata M, Sakaki Y (2001) Crucial role of type 1, but not type 3, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) receptors in IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release, capacitative Ca<sup>2+</sup> entry, and proliferation of A7r5 vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 88 (2) 202-209.
211. Wang X, Luebbe P, Gruenstein E, Zemlan F (1998) Apolipoprotein E (ApoE) peptide regulates tau phosphorylation via two different signaling pathways. *J Neurosci Res.* 51 (5) 658-665.
212. Wang XS, Gruenstein E (1997) Rapid elevation of neuronal cytoplasmic calcium by apolipoprotein E peptide. *J Cell Physiol.* 173 (1) 73-83.

213. Weeber EJ, Savage DD, Sutherland RJ, Caldwell KK (2001) Fear conditioning-induced alterations of phospholipase c-beta1a protein level and enzyme activity in rat hippocampal formation and medial frontal cortex. *Neurobiol Learn Mem.* 76 (2) 151-182.
214. Wei H, Leeds PR, Qian Y, Wei W, Chen R, Chuang D (2000)  $\beta$ -amyloid peptide-induced death of PC 12 cells and cerebellar granule cell neurons is inhibited by long-term lithium treatment. *Eur J Pharmacol.* 392 (3) 117-123.
215. Wesierska-Gadek J, Schmid G (2001) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the stability of the wild-type p53 protein. *Cell Mol Biol Lett.* 6 (2) 117-140.
216. White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL, Bush AL, Cappai R (2001) Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways *J Neurochem.* 76 1509-1520.
217. Whitson JS, Glabe CG, Shintani E, Abcar A, Cotman CW (1990) Beta-amyloid protein promotes neuritic branching in hippocampal cultures. *Neurosci Lett.* 110 (3) 319-324.
218. Whitson JS, Selkoe DJ, Cotman CW (1989) Amyloid beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science* 243 (4897) 1488-1490.
219. Wiśniewski T, Castano EM, Gołabek A, Vogel T, Frangione B (1994) Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol.* 145 (5) 1030-1035.
220. Wiśniewski T, Frangione B (1992) Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett.* 135 (2) 235-238.
221. Wolf LA, Laster SM (1999) Characterization of arachidonic acid-induced apoptosis. *Cell Biochem Biophys.* 30 (3) 353-368.
222. Xu H, Greengard P, Gandy S (1995) Regulated formation of Golgi secretory vesicles containing Alzheimer beta-amyloid precursor protein *J Biol Chem.* 270 (40) 23243-23245.
223. Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrikson RL, Gurney ME (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402 (6761) 533-537.
224. Yan R, Han P, Miao H, Greengard P, Xu H (2001) The Transmembrane Domain of the Alzheimer's beta -Secretase (BACE1) Determines Its Late Golgi Localization and Access to beta -Amyloid Precursor Protein (APP) Substrate. *J Biol Chem.* 276 36788-36796.

225. Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL (1989) Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 245 (4916) 417-420.
226. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250 (4978) 279-282.
227. Yasuda Y, Yoshinaga N, Murayama T, Nomura Y (1999) Inhibition of hydrogen peroxide-induced apoptosis but not arachidonic acid release in GH3 cell by EGF. *Brain Res.* 850 (1-2) 197-206.
228. Yoshiike Y, Tanemura K, Murayama O, Akagi T, Murayama M, Sato S, Sun X, Tanaka N, and Takashima A (2001) New Insights on How Metals Disrupt Amyloid beta Aggregation and Their Effects on Amyloid beta Cytotoxicity *J. Biol. Chem.* 276 32293-32299.
229. Yudowski GA, Efendiev R, Pedemonte CH, Katz AI, Berggren PO, Bertorello AM (2000) Phosphoinositide-3 kinase binds to a proline-rich motif in the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  subunit and regulates its trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97 (12) 6556-6561.
230. Yufu F, Egashira T, Yamanaka Y (1994) Age-related changes of cholinergic markers in the rat brain. *Jpn J Pharmacol.* 66 (2) 247-255.
231. Zambrzycka A, Strosznajder JB (2001) Effect of Amyloid beta peptide on cholinergic receptor mediated Poly(ADP-ribose)polymerase activity in rat brain. *Folia Neuropathol.* 39 Suppl. A 51-54.
232. Zambrzycka A, Strosznajder RP, Strosznajder JB (2000) Aggregated amyloid beta peptide 1-40 significantly decreases Ca<sup>2+</sup> and cholinergic receptor mediated phosphoinositides degradation by alteration of membrane and cytosolic phospholipase C in brain cortex. *Neurochem. Res.* 25 (2) 189-196.
233. Zhang D, Dhillon M., Prasad R, Markesbery WR (1998) Regional levels of brain phospholipase C $\gamma$  in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 811 161-165.
234. Zhang J, Pieper A, Snyder SH (1995) Poly(ADP-Ribose)Synthetase Activation: An Early Indicator of Neurotoxic DNA Damage. *J. Neurochem.* 65 (3) 1411-1414.
235. Zubenko GS, Stiffler JS, Hughes HB, Martinez AJ (1999) Reductions in brain phosphatidylinositol kinase activities in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 45 (6) 731-736.