

Joanna Ewa Kowalczyk

KINAZA BIAŁKOWA C W MITOCHONDRIACH
A PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU ISCHEMICZNEGO
W MÓZGU GRYZONI

Rozprawa doktorska



LS308

H4334

INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
IM. MIROŚŁAWA MOSSAKOWSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Promotor: doc. dr hab. Barbara Zabłocka

Praca została wykonana w Pracowni Biologii Molekularnej

Warszawa 2010

Mojej wspaniałej promotorce i szefowej **dr hab. Barbarze Zabłockiej** za wiarę we mnie i za wielkie wsparcie, mobilizację i okazywaną wyrozumiałość na wszystkich etapach tworzenia niniejszej pracy doktorskiej.

Małgosi Beręsewicz i Marysi Adamiak za pomocną dłoń przy wykonywaniu niektórych doświadczeń oraz przemiłą atmosferę pracy, którą potrafiły stworzyć.

Wszystkim przychylnym osobom z Instytutu, które wiernie dopingowały mnie do pracy.

Rodzicom i przyjaciołom za motywację.

Dziękuję.

Wyniki zamieszczone w niniejszej pracy zostały częściowo opublikowane w następujących artykułach:

1. **Kowalczyk J.E.**, Beręsewicz M., Gajkowska B., Zabłocka B.
Association of protein kinase C delta and phospholipid scramblase 3 in hippocampal mitochondria correlates with neuronal vulnerability to brain ischemia. *Neurochem. Int.* 2009. Jul-Aug;55(1-3):157-63
2. Bednarczyk P., **Kowalczyk J.E.**, Dołowy K., Szewczyk A., Zabłocka B.
Kanał potasowy regulowany napięciem w mitochondriach hipokampa. *Medycyna Dydaktyka Wychowanie*, Vol. XL, Supplement 1/2008: 11-14

Praca została finansowana dzięki środkom uzyskanym z grantów MNiSW: własnego 2P04A024 28 oraz Polska Sieć Mitochondrialna MitoNet.pl.

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
STRESZCZENIE	8
1. WSTĘP	13
1.1 Choroba niedokrwienność mózgu oraz modele opóźnionej śmierci neuronów	13
1.2 Niedokrwienie mózgu a neuroprotekcja	15
1.3 Rola mitochondriów w poischemicznym przeżyciu i śmierci komórki	15
1.4 Kinazy białkowe a mitochondria	16
1.5 Kinazy białkowe C – budowa i funkcja w komórce	18
1.6 Udział kinaz białkowych C w przekazywaniu sygnału ischemicznego	19
1.7 Wybrane izoformy kinazy białkowej C w mitochondriach i ich rola w protekcji oraz uszkodzeniu komórkowym	19
1.8 Mitochondrialni „partnerzy” białkowi kinazy białkowej C	21
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	23
3. MATERIAŁY I METODY	24
3.1 Materiał badawczy	24
3.2 Odczynniki	24
3.3 Skład buforów i roztworów użytych do doświadczeń	25
3.4 Modele badawcze	25
3.4.1 Globalna ischemia przodomózgowia myszokoczka mongolskiego	26
3.4.1.1 Izolacja mitochondriów z hipokampów myszokoczka mongolskiego	26
3.4.2 Hodowla organotypowa skrawków hipokampa szczura	27
3.4.2.1 Zakładanie i przebieg hodowli	27
3.4.2.2 Ekscytotoksyczne uszkodzenie neuronów hipokampa <i>in vitro</i>	27
3.4.2.3 Określanie przeżycia skrawków hipokampa szczura metodą barwienia jodkiem propidyny	28
3.4.2.4 Analiza wyników	29
3.5 Badania elektrofizjologiczne	29
3.5.1 Otrzymywanie mitoplastów	29
3.5.2 Technika patch-clamp	30
3.6 Badania molekularne	30
3.6.1 Analiza ekspresji PLSCR3 na poziomie mRNA	30
3.6.1.1 Projektowanie starterów	30
3.6.1.2 Izolacja RNA z tkanek	32
3.6.1.3 Badanie ekspresji wybranych genów	32
3.6.1.4 Elektroforeza w żelu agarozowym	33
3.6.1.5 Oczyszczanie produktu PCR i sekwencjonowanie	33
3.6.2 Analiza na poziomie białka	33
3.6.2.1 Oznaczanie stężenia białka	33
3.6.2.2 Immunodetekcja z zastosowaniem metody Western Blot (WB)	33
3.6.2.3 Metody badania oddziaływań białko-białko	35
3.6.2.3.1 Koimmunoprecypitacja	35

3.6.2.3.2	Chromatografia typu „pull – down“	36
3.6.2.4	Elektroforeza SDS-PAGE i srebrzenie białek do analizy metodą spektrometrii mas	37
3.6.2.5	Precypitacja białek z roztworu	37
3.6.2.6	Spektrometria mas	38
3.6.3	Analiza na poziomie tkanki	38
3.6.3.1	Badania immunocytochemiczne i obrazowanie w mikroskopie elektronowym	38
3.6.3.2	Badania immunohistochemiczne i obrazowanie w mikroskopie konfokalnym	39
3.7	Metody analizy bioinformatycznej i statystycznej	40
3.7.1	Analiza densytometryczna i statystyczna wyników	40
3.7.2	Analiza danych rejestrowanych techniką patch-clamp	41
3.7.3	Analiza wyników spektrometrii mas	41
4.	WYNIKI	42
4.1	Występowanie kinazy białkowej C w mitochondriach hipokampów w przebiegu ischemii i reperfuzji mózgu myszokoczka mongolskiego	42
4.2	Translokacja wybranych izoform PKC β , δ i γ do mitochondriów wyizolowanych z dwóch rejonów hipokampa myszokoczka po ischemii i krótkim oraz długim czasie reperfuzji	43
4.3	Poszukiwanie mitochondrialnych białkowych partnerów PKC δ	45
4.3.1	Skrambლაza fosfolipidów 3 (PLSCR3) jest wyrażana w mózgu gryzoni na poziomie mRNA	45
4.3.2	PLSCR3 jest wyrażana w mózgu na poziomie białka	46
4.3.3	PLSCR3 występuje głównie w mitochondriach	47
4.3.4	PKC δ tworzy kompleks z PLSCR3 w mitochondriach wyizolowanych z mózgu myszokoczka mongolskiego po krótkotrwałej ischemii	48
4.4	Poszukiwanie mitochondrialnych partnerów białkowych PKC β	50
4.4.1	Hamowanie aktywności PKC β <i>in vitro</i>	51
4.4.2	Charakterystyka kanału potasowego regulowanego napięciem obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej hipokampa myszokoczka mongolskiego	52
4.4.2.1	Właściwości biofizyczne mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego napięciem	53
4.4.2.2	Wpływ kompleksu ATP/Mg ²⁺ oraz jonów wapnia na aktywność kanału potasowego regulowanego napięciem obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej mózgu myszokoczka mongolskiego	54
4.4.2.3	Wpływ margatoksyny i agitoksyny-2 na aktywność kanału potasowego regulowanego napięciem obecnego w mitochondriach mózgu myszokoczka mongolskiego	55
4.4.2.4	PKC β – inhibitor mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego napięciem	57
4.4.2.5	Badanie obecności mitochondrialnego kanału potasowego zależnego od napięcia Kv1.3 w mitochondriach mózgu myszokoczka	57
4.4.2.6	Podjednostka kanału potasowego zależnego od napięcia Kv1.3 jest wyrażana w mitochondriach myszokoczka – analiza Western blot	58
4.4.2.7	Kolokalizacja białka Kv1.3 z oksydazą cytochromową - markerem mitochondrialnym	59
4.5	Poszukiwanie białek mitochondrialnych oddziałujących z PKC β I	60
5.	DYSKUSJA	64
6.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	75
7.	LITERATURA	76

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AgTx-2	agitoksyna-2 (ang. <i>agitoxin-2</i>)
ANT	mitochondrialna translokaza nukleotydów adeninowych (ang. <i>mitochondrial adenine nucleotide translocase</i>)
APS	nadsiarczan amonu (ang. <i>ammonium persulfate</i>)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan (ang. <i>adenosine-5'-triphosphate</i>)
BSA	surowicza albumina wołowa (ang. <i>bovine serum albumin</i>)
CA 1-4	róg Amona; pola hipokampa (łac. <i>Cornu Ammonis</i>)
CL	kardiolipina (ang. <i>cardiolipin</i>)
Cox IV	oksydaza cytochromowa, kompleks IV (ang. <i>cytochrome c oxidase</i> lub <i>complex IV</i>)
ctx	kora mózgowa (łac. <i>cortex</i>)
CYT C	cytochrom c (ang. <i>cytochrome c</i>)
DAG	diacyloglicerol (ang. <i>diacyloglycerol</i>)
DG	zakręt zębaty hipokampa (łac. <i>dentus gyrus</i>)
DTT	ditiotreitol
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy, kwas wersenowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGTA	kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetraoctowy (ang. <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>)
ER	siateczka śródplazmatyczna (ang. <i>endoplasmic reticulum</i>)
G	myszokoczek mongolski (ang. <i>Mongolian gerbil</i>)
IbTx	iberiotoksyna (ang. <i>iberiotoxin</i>)
IP	punkt izoelektryczny (ang. <i>isoelectric point</i>)
ip	immunoprecypitacja
I/R	ischemia/reperfuzja
InsP3R	receptor inozytolo-1,4,5-trifosforanu (ang. <i>inositol triphosphate receptor</i>)
J	ludzkie komórki limfoidalne (Jurkat) (ang. <i>Jurkat cells</i>)
Kv1.3	podjednostka 1.3 kanału potasowego regulowanego napięciem (ang. <i>voltage-gated potassium channel subunit 1.3</i>)
Mt	mikrotubule
mito	mitochondria
mitoK _{ATP}	mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP (ang. <i>mitochondrial ATP-sensitive potassium channel</i>)

MgTx	margatoksyna (ang. <i>margatoxin</i>)
MPTP	megakanał mitochondrialny (ang. <i>mitochondrial permeability transition pore</i>)
OGD	model uszkodzenia komórek <i>in vitro</i> przez czasowe wycofanie z pożywki hodowlanej tlenu i glukozy (ang. <i>oxygen-glucose deprivation</i>)
P2	frakcja komórkowa wzbogacona w mitochondria
PFA	paraformaldehyd
PI	jodek propidyny (ang. <i>propidium iodide</i>)
PKC	kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i>)
PLSCR3	skramblaza fosfolipidów 3 (ang. <i>phospholipid scramblase 3</i>)
PMSF	fluorek fenylometylosulfonowy (ang. <i>phenylmethylsulphonyl fluoride</i>)
PSD 95	białko zagęszczeń postsynaptycznych (ang. <i>postsynaptic density protein 95</i>)
SB	bufor Laemmli'ego do nakładania prób na elektroforezę (ang. <i>sample buffer</i>)
SDS	sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
tBID	aktywna forma białka BID (ang. <i>truncated BID</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
Trx	tiodoksyna (ang. <i>thioredoxin</i>)
VDAD	kanał zależny od potencjału o selektywności anionowej (ang. <i>voltage-dependent anionic channel</i>)
WB	metoda Western Blot

STRESZCZENIE

Niedokrwienie mózgu powodowane ogniskowym bądź globalnym przemijającym zahamowaniem dopływu krwi do mózgu wraz z jego powikłaniami to jedno z najpoważniejszych w skutkach ludzkich schorzeń naszych czasów, któremu wciąż nie można skutecznie zapobiec. Efekty udaru lub ataku niedokrwiennego mózgu, w zależności od czasu trwania ischemii i rozległości niedokrwionego obszaru, mogą być niezauważalne lub powodować częściowy bądź całkowity trwały paraliż, a nawet śmierć. Jednym z najbardziej podatnych na uszkodzenie wywołane niedokrwieniem rejonów mózgu jest hipokamp, w szczególności rejon CA1 określany jako rejon wrażliwy na niedokrwienie. Do badania skutków udaru stosujemy głównie model przejściowej ischemii przodomózgowia. W modelu tym, po 5 minutowym niedokrwieniu mózgu myszokoczka (*Meriones unguiculatus*) poprzez zaciśnięcie tętnic szyjnych wspólnych obserwuje się ubytki neuronów w sektorze CA1 hipokampów po 2-3 dniach reperfuzji, a po upływie 7 dni od niedokrwienia ponad 80% neuronów wrażliwej okolicy CA1 hipokampa zanika. Ten złożony, wieloczynnikowy proces prowadzący do śmierci opisywany jest jako opóźniona, selektywna poniedokrwienna śmierć neuronów. Jednocześnie sąsiednie rejony hipokampa obejmujące sektory CA2-4 i zakręt zębaty (DG, *Dentus Gyrus*), nie ulegają uszkodzeniu po krótkotrwałym niedokrwieniu, co może wskazywać na aktywację mechanizmów protekcyjnych w komórkach, pozwalających na przezwyciężenie stresu ischemiczno-reperfuzyjnego. Dlatego interesujące i ważne dla przyszłych terapii neuroprotekcyjnych wydają się badania endogennych mechanizmów ochronnych, które prawdopodobnie aktywowane są w rejonach CA2-4, DG hipokampa w modelach globalnej ischemii. Wzmocnienie naturalnych mechanizmów lub znalezienie opartych o nie terapii może stać się nową strategią terapeutyczną w leczeniu skutków niedokrwienia mózgu.

Mitochondria są organellami, których zmiana metabolizmu jest ściśle powiązana z ischemią. Wiadomo, że mitochondria jako pierwsze silnie i gwałtownie reagują na zatrzymanie dopływu do mózgu krwi transportującej tlen oraz glukozę zahamowaniem aktywności łańcucha oddechowego i produkcji związków wysokoenergetycznych. Brak ATP prowadzi do ekscytotoksyczności glutaminianu, a w późniejszym czasie do uwolnienia cytochromu c z mitochondriów i apoptozy. Białkami, które pełnią kluczową rolę w utrzymaniu równowagi pomiędzy wieloma procesami w komórce, w tym także pomiędzy funkcjami prożyciowymi dla komórek a ich apoptozą, są kinazy białkowe. Liczne z nich zostały zlokalizowane zarówno w błonach mitochondrialnych, w przestrzeni pomiędzy nimi, jak i w macierzy mitochondrialnej. Zaliczamy do nich kinazy PKA, Akt, PKC czy

JNK, jednak nadal nie jest znany mechanizm ich translokacji do mitochondriów. Z nielicznych badań wynika, że wraz z ich przemieszczeniem się do mitochondriów zmianie ulega aktywność niektórych białek mitochondrialnych (np. poprzez fosforylację lub tworzenie kompleksów), dla których mogą być „partnerami komunikacyjnymi” w uruchomieniu np. kaskady sygnałowej dla rozpoczęcia procesu ochronnego komórki lub jej degradacji. Pomimo wielu lat badań wciąż nie jest w pełni jasne jak dochodzi do uwalniania cytochromu c z mitochondriów, jakie białka mogą uczestniczyć w tym procesie i jaka jest rola kinaz białkowych w tym zjawisku.

W pracy uwaga skierowana została na kinazę białkową C, bowiem w ostatnich latach coraz częściej określa się niektóre z izoform PKC mianem kluczowych mediatorów sygnału ischemicznego w mózgu i sercu, tym samym przypisując im bezpośredni udział w procesach związanych ze śmiercią komórek lub ich przeżyciem. Zauważno, że reagują one na stres ischemiczny szybką zmianą aktywności obserwowaną już w pierwszym okresie po przywróceniu krążenia. Mimo rozległej wiedzy o procesach poniedokrwiennych w mózgu nie ma informacji na temat potencjalnych oddziaływań kinazy białkowej C z mitochondriami. Badania *in vitro* na komórkach nowotworowych pokazują, że PKC δ oddziałuje z mitochondrialnym enzymem skramblazą fosfolipidów (PLSCR3), który uczestniczy w utrzymaniu homeostazy białkowo-lipidowej błon mitochondrialnych, ale też może uczestniczyć w uwalnianiu białek proapoptotycznych. W dostępnym piśmiennictwie nie ma danych o występowaniu PLSCR3 w mózgu. Inna izoforma, PKC ϵ związana z mitochondriami wydaje się uczestniczyć w hartowaniu ischemicznym serca. W modelu poniedokrwiennnej śmierci neuronów w mózgu myszokoczka różna wrażliwość sektorów hipokampa na krótkotrwałe niedokrwienie może sugerować udział kinaz białkowych C zarówno w procesach prowadzących do eliminacji neuronów jak i w endogennej neuroprotekcji.

Za cel badań w przedstawionej tu rozprawie postawiono sobie i) zbadanie, jakie izoformy kinazy białkowej C przemieszczają się do mitochondriów pod wpływem 5 minutowej ischemii i reperfuzji mózgu myszokoczka mongolskiego, ii) sprawdzenie czy w czasie reperfuzji po niedokrwieniu poziom immunoreaktywności wybranych izoform PKC w mitochondriach różni się pomiędzy rejonami hipokampa (CA1 – rejon wrażliwy na niedokrwienie w porównaniu z CA2-4, DG – rejonami mniej wrażliwymi na krótkotrwały epizod ischemiczny), a następnie iii) zweryfikowanie hipotezy, że PKC δ może brać udział w eliminacji neuronów poprzez oddziaływanie ze skramblazą fosfolipidów w sektorze CA1 natomiast PKC β może uczestniczyć w endogennym mechanizmie ochronnym neuronów w

rejonach CA2-4, DG hipokampa poprzez oddziaływanie z kanałami potasowymi lub innymi białkami mitochondrialnymi.

Aby odpowiedzieć na dwa pierwsze pytania wykonano serię doświadczeń, w których badano wpływ krótkiego niedokrwienia i różnych okresów reperfuzji na poziom immunoreaktywności izoform PKC (metoda Western Blot) we frakcji mitochondriów izolowanych z całych hipokampów myszokoczka. Do dalszych badań na fragmentach hipokampów (na części wrażliwej i względnie odpornej na niedokrwienie) wybrano izoformy β , δ oraz γ . Poziom immunoreaktywności PKC β wzrastał w mitochondriach obszaru CA2-4, DG, podczas gdy PKC δ wzrastał w rejonie wrażliwym. Na podstawie tych danych można pokusić się o postawienie hipotezy o przeciwstawnym udziale izoform β i δ w mitochondriach mózgu w procesach wpływających na losy komórek w przebiegu reperfuzji po niedokrwieniu, gdzie PKC β może być związana z regeneracją, czyli uruchomieniem wewnętrznych mechanizmów adaptacyjnych, a PKC δ prawdopodobnie może być włączona w proces eliminacji neuronów.

Idąc tym tokiem rozumowania w kolejnych badaniach chciano wykazać słuszność, bądź odrzucić stawianą hipotezę. Z literatury wiadomo, że proapoptotyczna aktywacja mitochondrialnej skramblazy fosfolipidów (PLSCR3) związana jest z fosforylacją przez PKC δ , co wykazano *in vitro* na komórkach HeLa. Zatem kolejne doświadczenia należało rozpocząć od sprawdzenia występowania PLSCR3 w mózgu myszokoczka. Badania wykonane trzema uzupełniającymi się metodami wskazują na ekspresję białka PLSCR3 w mózgu oraz jego lokalizację w mitochondriach. Stosując metodę immunocytochemiczną w mikroskopie elektronowym pokazano, że PLSCR3 występuje głównie w mitochondriach, ale także z błonie jądrowej, siateczce śródplazmatycznej, plazmalemmie oraz może być związana z mikrotubulami. Zaprezentowane następnie wyniki ko-immunoprecypitacji PKC δ i PLSCR3 w mitochondriach wyizolowanych z hipokampów po niedokrwieniu oraz mitochondrialna kolokalizacja w rejonie CA1 hipokampa obserwowana w mikroskopie elektronowym po niedokrwieniu i reperfuzji wskazują, że oba te białka wspólnie występują w mitochondriach. Wydaje się, że mogą uczestniczyć w mechanizmie prowadzącym do uwolnienia cytochromu c, podobnie jak było to wcześniej opisane *in vitro*. Dzięki otrzymanym wynikom można sugerować, iż poischemiczny wzrost immunoreaktywności PKC δ w mitochondriach w rejonie wrażliwym na niedokrwienie może wiązać się z wpływem cytochromu c przez zewnętrzną błonę mitochondrialną do cytoplazmy i procesem eliminacji neuronów.

W dalszym etapie badań podjęto próby weryfikacji hipotezy, że poischemiczny wzrost poziomu immunoreaktywności PKC β w mitochondriach może być związany z uruchomieniem mechanizmu regeneracji komórek w obszarze CA2-4, DG hipokampa po epizodzie niedokrwiennym. Badania z wykorzystaniem organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura w modelu uszkodzenia ekscytotoksycznego *in vitro* wykazały, że zastosowanie inhibitora PKC β nasila uszkodzenie hipokampa w obszarze CA1 oraz mniej wrażliwym na uszkodzenie CA2-4, DG.

Poszukiwanie mitochondrialnych substratów PKC β metodą elektrofizjologiczną wykazało istnienie w mitochondriach hipokampa myszokoczka nowego kanału potasowego regulowanego napięciem o częściowych właściwościach farmakologicznych kanału Kv1.3. Pierwsze wykonane przez nas doświadczenia wskazują na hamowanie aktywności i zamknięcie kanału przez PKC β I. Nie wiemy natomiast, jaki jest charakter oddziaływań pomiędzy białkami oraz co oznacza nieodwracalność hamowania aktywności kanału. Obecnie wydaje się, że otwarcie, a nie zamknięcie mitochondrialnych kanałów potasowych jest protekcyjne w uszkodzeniu ischemiczno-reperfuzyjnym. Otwarcie mitochondrialnych kanałów potasowych związane jest z obniżeniem produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), jednak z drugiej strony znane są liczne doniesienia mówiące, że pewien poziom ROS jest niezbędny do wytworzenia zjawiska hartowania ischemicznego, zatem może obserwowane przez nas zamknięcie Kv1.3 pod wpływem PKC β I jest elementem modulacji poziomu reaktywnych form tlenu w mitochondriach mózgu.

W kolejnym podejściu metodycznym zmierzającym do znalezienia mitochondrialnych białek oddziałujących z PKC β I zastosowano chromatografię powinowactwa i analizę metodą spektrometrii mas. Znaleziono szereg białek potencjalnie oddziałujących z interesującym nas enzymem. Należą do nich: mitochondrialna kinaza kreatynowa (Mt-CK), translokaza ATP-ADP (ANT), dehydrogenaza jabłczanowa i izocytrynianowa, oksydoreduktaza NADH-ubichinon, podjednostki α i β kompleksu F_1-F_0 ATPazy mitochondrialnej, dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanu (G3P-DH) oraz tioredoksyna (Trx). Wszystkie wymienione powyżej białka uczestniczą w metabolizmie energetycznym komórek i mogą wpływać na tworzenie reaktywnych form tlenu. Można przypuszczać, że regulacja metabolizmu glukozy, utrzymanie homeostazy związków wysokoenergetycznych odgrywa istotną rolę w procesach regeneracyjnych w epizodach ischemiczno-reperfuzyjnych.

Otrzymane przez nas wyniki rodzą wiele nowych pytań i sugerują dalsze badania. Jednak na etapie tej rozprawy możemy wyciągnąć główny wniosek mówiący o tym, że izoformy delta i beta PKC być może mogą pełnić przeciwstawne role w integrowaniu sygnału ischemicznego-reperfuzyjnego w mitochondriach mózgu, gdzie PKC δ może być związana z przebudową błon mitochondrialnych, mogącą prowadzić do uwolnienia cytochromu c i apoptozy, natomiast PKC β wydaje się brać udział w endogennym mechanizmie protekcji/regeneracji komórek po krótkim epizodzie niedokrwiennym. Sugerujemy, że białka, z którymi oddziałuje PKC β w mitochondriach mogłyby być związane z metabolizmem glukozy, budowaniem potencjału elektrochemicznego wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz tworzeniem i usuwaniem reaktywnych form tlenu w mitochondriach.

1. WSTĘP

1.1 Choroba niedokrwienna mózgu oraz modele opóźnionej śmierci neuronów

Niedokrwienie (ischemia) mózgu i jego powikłania to jedno z najpoważniejszych w skutkach ludzkich schorzeń XXI wieku, któremu nadal nie umiemy skutecznie zapobiegać jak też znacząco ograniczać jego następstwa. Problem, z którym wciąż borykają się lekarze oraz badacze wiąże się z trudnym do określenia czasem wystąpienia wylewu krwi do mózgu (udar krwotoczny, 15% przypadków) bądź oszacowania momentu przerwania jej dopływu (udar niedokrwienny, 85%), bowiem wraz z wydłużeniem czasu niedokrwienia zmniejsza się szansa na skuteczne leczenie następstw ischemii.

Skutkiem udaru niedokrwiennego mózgu może być częściowe lub całkowite, trwałe porażenie, a nawet śmierć. W Polsce udar mózgu jest drugą pod względem częstości, po chorobie niedokrwiennej serca, przyczyną zgonów oraz główną przyczyną niesprawności w populacji osób dorosłych (Gasecki i wsp., 2006). Terminem udar mózgu (ang. *stroke*) określamy nagłe zaburzenie krążenia mózgowego, utrzymujące się powyżej 24 godzin, na skutek zamknięcia lub zwężenia światła naczyń śródmózgowych albo doprowadzających krew do mózgu (udar niedokrwienny), czy też pęknięcia naczynia powodując tzw. udar krwotoczny. Udarem nie jest przejściowy atak niedokrwienny powodujący objawy trwające poniżej 24 godzin, określane jako przemijające niedokrwienie mózgu (ang. *transient ischemic attack* - TIA). Nie zawsze w przypadku szybkiej reperfuzji następuje całkowita poprawa stanu zdrowia pacjenta, gdyż liczne badania wykazały, że podczas spontanicznej reakcji przywrócenia krążenia wytwarzają się m.in. reaktywne formy tlenu, które mogą być toksyczne dla komórek. Niezwykle podatnym i wrażliwym na uszkodzenie ischemiczne rejonem mózgu jest hipokamp, a dokładnej jego komórki piramidowe z części CAI. Zjawisko ich nadwrażliwości badane jest od lat, lecz nadal stanowi nierozwiązany problem badawczy.

Istnieje kilka modeli doświadczalnych umożliwiających obserwację przejściowej ischemii przodomózgowia, które dzielą się na modele *in vivo* oraz *in vitro*. Udar mózgu skutkujący ogniskowym uszkodzeniem wywoływany jest przez zamknięcie przepływu krwi w tętnicy środkowej mózgu szczura lub myszy na okres do kilku godzin (MCAO), w wyniku, którego w rejonie niedokrwienia powstaje obszar martwicy otoczony penumbłą (Matsumoto i wsp., 2002). Rozmiar obszaru otaczającego ognisko niedokrwienne zmienia się w czasie po reperfuzji i prawidłowe funkcje komórek znajdujących się w

zewewnętrznej części mogą zostać przywrócone, natomiast im bliżej ogniska udaru tym więcej komórek ulega degeneracji.

Wyróżnia się również wiele modeli czasowego, całkowitego zatrzymania krążenia mózgowego u zwierząt laboratoryjnych (Traystman, 2003). Wywoływanie u szczura czasowego zatrzymania akcji serca z następującą resuscytacją powoduje całkowity, czasowy brak krążenia mózgowego i odzwierciedla skutki zatrzymania akcji serca w klinice ludzkiej (Korpachev i wsp., 1982; Pluta i wsp., 1991). Dłuższe zatrzymanie krążenia prowadzi do nieodwracalnych zmian i śmierci, natomiast kilkuminutowe niedokrwienie zakończone reanimacją skutkuje zniszczeniem neuronów w rejonie CA1 hipokampa szczura powstającym na skutek wywołanych excytotoksycznością glutaminianu zmian obserwowanych w neuronach i komórkach glejowych (Oderfeld-Nowak i wsp., 2003; Sulkowski i wsp., 2006).

W kolejnym modelu przejściowej ischemii przedomózgowia, po 5 minutowym niedokrwieniu mózgu myszokoczek (*Meriones unguiculatus*), ubytki neuronów obserwowane są w sektorze CA1 hipokampów po 2-4 dniach reperfuzji (Kirino, 1982; Gadamski i Mossakowski, 1992). Podobny skutek czasowego niedokrwienia mózgu występuje również w modelu ischemii u szczura wywołanej przez zamknięcie obu tętnic kręgowych (stałe) i tętnic szyjnych wspólnych (czasowe) (tzw. 4VO model) (Pulsinelli i Buchan, 1988; Pahlmark i wsp., 1993; Krajewski i wsp., 1995; Traystman, 2003), czy poprzez czasowe (około 20 minut) zaciśnięcie tętnic szyjnych wspólnych u szczura z równoczesnym obniżeniem ciśnienia tętniczego krwi (Eklof i Siesjo, 1972; Friberg i wsp., 2002). We wszystkich modelach ischemii zanik neuronów we wrażliwych rejonach mózgu stanowi kontinuum nekrotyczno-apoptotyczne i ma wiele cech charakterystycznych zarówno dla procesu nekrozy jak i dla programowanej śmierci komórek (Domanska-Janik i wsp., 1999; Ueda i Fujita, 2004). W modelach ischemii uogólnionej u szczura jak i u myszokoczka, po upływie 7 dni od niedokrwienia większość (ponad 80 %) neuronów wrażliwej okolicy CA1 hipokampa ginie, a złożony, wieloczynnikowy proces prowadzący do śmierci opisywany jest jako opóźniona, selektywna, poniedokrwieniona śmierć neuronów (Kirino, 1982; Wieloch T. i Kamme F., 1998; Domanska-Janik i wsp., 1999). Jednocześnie sąsiednie rejony hipokampa obejmujące sektory CA2-4 i zakręt zębaty (DG, *Dentus Gyrus*), narażone na ten sam epizod niedokrwienności nie ulegają uszkodzeniu, co może wskazywać na aktywację mechanizmów protekcyjnych w komórkach, pozwalających na przezwyciężenie stresu ischemiczno-reperfuzyjnego.

1.2 Niedokrwienie mózgu a neuroprotekcja

Wciąż brak jest skutecznego leku mogącego mieć bezpieczne i nieograniczone wąskim oknem terapeutycznym zastosowanie w leczeniu skutków niedokrwienia mózgu u ludzi. W nielicznych przypadkach zastosowanie mają jedynie kwas acetylosalicylowy oraz rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu (alteplaza). Jednak wspomniane wyżej wąskie okno terapeutyczne pozwala na ich podanie wybranym pacjentom jedynie w pierwszych trzech godzinach po wystąpieniu udaru (Skibicka i wsp., 2009). Dlatego wciąż trwają poszukiwania skutecznego leczenia neuroprotekcijnego, jednak do tej pory żadnego z testowanych związków nie udało się wprowadzić do kliniki. Niepowodzenia te spowodowane są najczęściej zbyt dużą ilością działań ubocznych testowanych substancji (Członkowska, 2008), lecz nie zniechęcają one do dalszego zgłębiania mechanizmów poniedokrwiennej śmierci neuronów oraz badania endogennych mechanizmów zwiększających szanse przeżycia krótkotrwałego niedokrwienia, które prawdopodobnie aktywowane są w rejonach CA2-4, DG hipokampa w modelach globalnej ischemii. Wzmocnienie naturalnych mechanizmów lub znalezienie opartych o nie terapii może stać się nową strategią terapeutyczną w leczeniu skutków niedokrwienia mózgu (Dluzniewska i wsp., 2005; Grieb, 2005).

1.3 Rola mitochondriów w poischemicznym przeżyciu i śmierci komórki

Najnowsze badania wydają się potwierdzać dawno powstałą hipotezę o kluczowej roli mitochondriów w uszkodzeniu poischemicznym (Fiskum, 1983; Fiskum i wsp., 1999). Mitochondria, oprócz swej powszechnie znanej funkcji tworzenia związków wysokoenergetycznych biorą czynny udział w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, poziomu reaktywnych form tlenu oraz procesu apoptozy. Mitochondria, jako pierwsze reagują na brak dopływu krwi do mózgu, na brak tlenu i glukozy, zahamowaniem aktywności łańcucha oddechowego i tworzenia ATP (Domanska-Janik i wsp., 1985), co w konsekwencji prowadzi do zaburzenia homeostazy jonowej i nadmiernego wyrzutu pobudzających aminokwasów (Lazarewicz, 2000; Lazarewicz i Salinska, 2005). W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że cytochrom c może, oprócz swojej funkcji w łańcuchu oddechowym, pełnić rolę aktywatora kompleksu białkowego (apoptosomu), którego składnikami są proenzymy proteolityczne – kaspazy 9 i 3. Aktywacja apoptosomu prowadzi do aktywacji kaskady kaspaz, w konsekwencji do degradacji komórki (Orrenius, 2004). Istnieje hipoteza zakładająca udział magakanalu (MPT) występującego w błonach mitochondrialnych, w wpływie do cytoplazmy białek o niskich masach cząsteczkowych, w

tym również cytochromu c i innych białek proapoptotycznych (AIF, endonukleaza G, Smac/Diablo) (Saelens i wsp., 2004). Jednak z doświadczeń z zastosowaniem związków zamykających kanał MPT wynika, że nie jest to jedyny mechanizm uwalniania białek z mitochondriów. W procesie tym podnoszona jest rola białek z rodziny Bcl, z których niektóre mają właściwości ochronne dla komórek (Bcl2, Bclxl) a inne sprzyjają uruchomieniu procesu apoptozy (Bax, Bid, Bad, Bik) (Krajewski i wsp., 1995; Cory i Adams, 2002). Obecnie wydaje się, że istotnym elementem przekazywania sygnału ischemicznego jest przemieszczanie się pomiędzy przedziałami komórkowymi wielu białek, które w zależności od lokalizacji i współpartnerów mogą pełnić różne funkcje. Do takich białek zalicza się m.in. kinazę białkową C (PKC), której specyficzne izoformy uważane są za białka pełniące kluczową rolę w transdukcji sygnału ischemiczno-reperfuzyjnego w różnych narządach, w tym mózgu i sercu. Jednak z racji wielu rozbieżnych doniesień wciąż nie jest do końca jasne czy izoformy PKC (najczęściej ϵ i δ) są zaangażowane jednoznacznie w przeżycie komórek po epizodzie niedokrwiennym czy w ich apoptozę (Bright i wsp., 2004). Dalej wykazano, że w dłuższym czasie po niedokrwieniu we frakcji mitochondriów zwiększa się ilość innej kinazy: JNK i proapoptotycznego białka Bad, a zmniejsza się ilość kinazy Raf-1. Również lokalizacja cytochromu c ulega dynamicznym zmianom w wyniku ischemii (Domanska-Janik i wsp., 2004). Obok swojego tradycyjnego miejsca w mitochondriach, występuje on w cytoplazmie oraz związany z siateczką śródplazmatyczną w komórkach po niedokrwieniu mózgu (Zablocka i wsp., 2003; Beresewicz i wsp., 2006). Cytochrom c prawdopodobnie uczestniczy nie tylko w aktywacji apoptosomu, ale także w regulacji sygnału wapniowego w komórce, co może prowadzić do wtórnego uszkodzenia mitochondriów (Beresewicz i wsp., 2006). Jednak mechanizm wpływu cytochromu c z mitochondriów nie jest w pełni wyjaśniony i wciąż jest w czołówce badań związanych z programowaną śmiercią komórki.

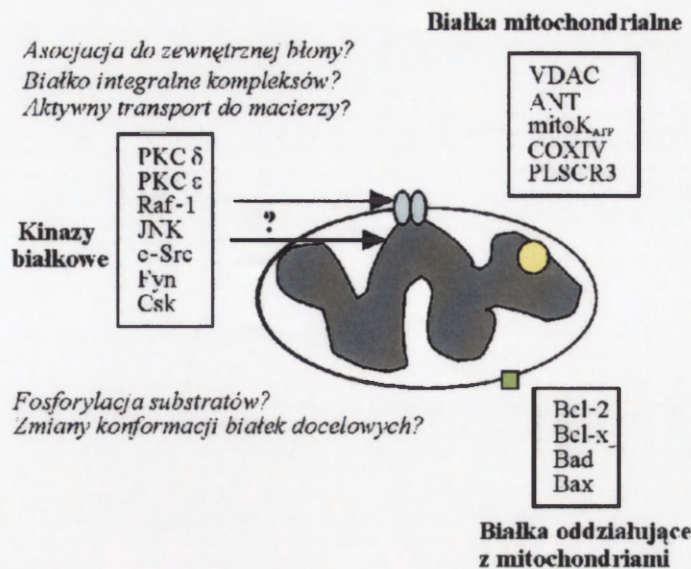
1.4 Kinazy białkowe a mitochondria

Badania ostatnich lat po raz kolejny potwierdzają jak istotną rolę odgrywają mitochondria w uszkodzeniu ischemiczno-reperfuzyjnym mózgu i serca. W chwili obecnej wydaje się, że bez fosforylacji i defosforylacji białek związanych z mitochondriami przez kinazy serynowe-treoninowe czy tyrozynowe, nie byłoby możliwe przekazanie sygnałów z cytoplazmy do mitochondriów. Czyni to kinazy białkowe kluczowymi białkami niezbędnymi do utrzymania równowagi pomiędzy wieloma procesami w komórce, w tym pomiędzy procesami prożyciowymi a apoptozą. Liczne kinazy białkowe zostały

zlokalizowane zarówno w błonach mitochondrialnych, w przestrzeni pomiędzy nimi, jak i w macierzy mitochondrialnej (Ryc. 1).

Aby kinazy białkowe mogły wejść na „mitochondrialny szlak sygnałowy“ i fosforylować bądź oddziaływać z białkami tworząc z nimi kompleksy, a tym samym zmieniać ich konformację i modulować funkcje, enzymy te muszą przemieścić się z cytoplazmy do błon lub wnętrza mitochondriów. W niektórych przypadkach, połączenie kinazy z błoną umożliwia jej aktywację. Nadal nie jest jednak znany mechanizm translokacji kinaz białkowych PKA, Akt, PKC czy JNK do mitochondriów. Nie są też w pełni opisane białka, które biorą udział w transporcie aktywnych domen kinaz białkowych. Wstępne badania sugerują udział białek transportujących TOM (*translocase of outer membrane*) oraz TIM (*translocase of inner membrane*) (Bolender i wsp., 2008), białek zdających się być kotwicą dla kinaz np. białek receptorowych RICK (*receptors for inactive C kinase*) i RACK (*receptors for activated C kinase*) dla izoform PKC (Frazier i wsp., 2003; Truscott i wsp., 2003) czy białek kotwiczących z rodziny AKAP dla PKA (Perkins i wsp., 2001). Dodatkowo przypuszcza się, że mitochondrialne białko PICK1 (*protein that interact with protein C kinase*) przenosi PKC α z cytosolu do mitochondriów (Wang i wsp., 2003), natomiast białko β 'COP (*β ' coatamer protein*) wydaje się być specyficznym mitochondrialnym białkiem RACK dla izoformy PKC ϵ (Csukai i wsp., 1997). Nie jest znany mechanizm transportu kinazy PKB/Akt do mitochondriów. Sugerowany jest udział translokazy białka szoku cieplnego w powiązaniu z białkiem TOM20 (Kobayashi i wsp., 2008).

Dodatkowo istnieje szereg kinaz białkowych towarzyszących kinazom białkowym docelowo przemieszczającym się do błon oraz wnętrza mitochondriów, które pośrednio wpływają na aktywację szlaków sygnałowych prowadzących do przeżycia lub śmierci komórek (Wang, 2006; Lasfer i wsp., 2006; Costa i wsp., 2008). Do takich kinaz należy m.in. cytoplazmatyczna kinaza białkowa G (PKG), która w wyniku krótkotrwałego, hartującego niedokrwienia serca jest aktywowana przez cykliczne GMP (cGMP). PKG prawdopodobnie fosforyluje nieznane białko w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, które w wyniku niezbadanego mechanizmu przenosi dalej sygnał do znajdującej się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej PKC ϵ . Wiele doświadczeń wskazuje, że aktywna PKC ϵ oddziałuje następnie z kanałem potasowym $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$. Fosforylacja bądź inne modulacje kanału dają wyraźny efekt cytoprotekcyjny (Costa i wsp., 2008).



Ryc.1 Proponowane kinazy białkowe oddziałujące z mitochondriami i ich mitochondrialne substraty lub białka, z którymi oddziałują. Kinazy białkowe zlokalizowane są w cytosolu komórki, a po aktywacji komórki mogą przemieszczać się do mitochondriów, gdzie łączą się z licznymi białkami, które fosforylują lub po połączeniu zmieniają ich konformację wpływając na ich aktywność, a tym samym na losy komórki. Zjawiska te obejmują i) hamowanie tworzenia MPTP, ii) aktywację kanału potasowego mitoK_{ATP}, iii) wzrost produkcji ATP poprzez regulację aktywności COXIV, iv) przebudowę architektury błon mitochondrialnych przez wzrost aktywności skramblazy fosfolipidów (PLSCR3), v) obniżenie aktywności antyapoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl_{xL}, vi) obniżenie aktywności proapoptotycznej białka BAD.

1.5 Kinazy białkowe C – budowa i funkcja w komórce

Kinazy białkowe C (PKC) to jedna z najliczniejszych rodzin kinaz serynowo-treoninowych. Aktywność izoform a) klasycznych (α , β I, β II i γ) zależy od stężenia jonów wapnia (Ca^{2+}) w cytosolu, od obecności wtórnego przekaźnika sygnału 1,2 diacyloglicerolu (DAG) oraz od fosfatydyloseryny (PS), b) nowych (δ , ϵ , θ i η) nie jest wrażliwa na zmiany stężenia Ca^{2+} , c) atypowych (ζ , μ i ν/λ) nie jest regulowana ani przez Ca^{2+} ani DAG (Parker i Murray-Rust, 2004). W komórce, PKC jest obecna zarówno w cytosolu w formie rozpuszczalnej (nieaktywna) jak i związana z błonami (forma aktywna). Pojedynczy polipeptyd PKC zawiera na swoim N-końcu rejon regulatorowy o wielkości przeciętnie około 50 kDa oraz mieszczący się na C-końcu rejon katalityczny, zazwyczaj o masie około 30 kDa. Poszczególne podgrupy izoform PKC, klasyczne, nowe i atypowe różnią się od siebie budową, która wpływa na sposób regulacji aktywności, specyficzność substratową, a tym samym na funkcje w komórce.

PKC występuje powszechnie u ssaków, we wszystkich typach tkanek i komórek. Do podstawowych i najistotniejszych funkcji PKC należy pośredniczenie w odpowiedziach komórek eukariotycznych na różne sygnały docierające z otoczenia, zaangażowanie w regulację wzrostu, różnicowanie, apoptozę oraz aktywację czynników transkrypcyjnych (Metzger i Kapfhammer, 2003; Steinberg, 2004; Corbalan-Garcia i Gomez-Fernandez, 2006). Kinazy białkowe C wiązane są również z procesem uczenia się i zapamiętywania (LTP) (Ramakers i wsp., 1997). W ostatnich latach coraz częściej określa się niektóre z izoform PKC kluczowymi mediatorami sygnału ischemicznego w mózgu i sercu, tym samym przypisując im bezpośredni udział w procesach związanych ze śmiercią komórki lub jej przeżyciem (Nakajima, 2006).

1.6 Udział kinaz białkowych C w przekazywaniu sygnału ischemicznego

Kinazy białkowe C reagują na stres ischemiczny szybką zmianą aktywności obserwowaną już w pierwszym okresie po przywróceniu krążenia (Domanska-Janik i Zablocka, 1993). W zagęszczeniach postsynaptycznych (PSD) po niedokrwieniu następuje 4-18-krotny przyrost ilości białka różnych izoform PKC w porównaniu z ich ilością u zwierząt kontrolnych (Hu i wsp., 1998; Zablocka i wsp., 2001). PKC obecnej w PSD przypisuje się rolę jednego z regulatorów aktywności receptora NMDA (Jimenez i Tapia, 2004) oraz wpływ na aktywność szlaku MAPK poprzez oddziaływanie z kinazą Raf-1 (Ueda i wsp., 1996). Różne izoformy PKC mogą lokować się w różnych przedziałach komórkowych, gdzie oddziałują ze specyficznymi substratami i pełnią szczególną rolę w przekazywaniu sygnału ischemicznego. I tak aktywacja PKC γ i wzmożona fosforylacja różnych białek wiązana jest ze zmniejszeniem obszaru uszkodzenia w ischemii ogniskowej (Aronowski i wsp., 2000). Z kolei PKC δ wydaje się uczestniczyć w uszkodzeniu ischemiczno-reperfuzyjnym (Bright i wsp., 2004). Badania niedokrwienia serca z wykorzystaniem peptydów regulujących aktywność specyficznych izoform PKC pozwoliły wykazać, że aktywacja PKC ϵ przed ischemią zabezpiecza serce przed uszkodzeniem, natomiast zahamowanie PKC δ w okresie po przewróceniu krążenia również zmniejsza rozległość uszkodzenia (Budasz i wsp., 2007).

1.7 Wybrane izoformy kinazy białkowej C w mitochondriach i ich rola w protekcji oraz uszkodzeniu komórkowym

W połowie lat 90-tych izoformy PKC α i β zostały wykryte w mitochondriach komórek gleju Müllera siatkówki oka karpia, gdzie metodą mikroskopii elektronowej

pokazano ich obecność w grzebieniach mitochondrialnych (Fernandez i wsp., 1995). Od tego czasu wzrosło zainteresowanie funkcją jaką mogłyby pełnić poszczególne izoformy PKC w mitochondriach.

Najwięcej doniesień literaturowych sugeruje udział dwóch izoform PKC: δ i ϵ w dwóch procesach komórkowych nierozdzielnie związanych z mitochondriami: w apoptozie i w hartowaniu ischemicznym serca.

Izoformie PKC δ najczęściej przypisywany jest udział w procesie apoptozy. Jej aktywność nie jest bezpośrednio regulowana przez Ca^{2+} . Badania na komórkach nowotworowych tj. keranocytach linii U-937 i MCF-7 wykazały translokację tej izoformy do mitochondriów (Steinberg, 2004). Nastęstwem hodowania komórek w obecności aktywatorów PKC - estrów forbolu lub wody utlenionej było uwolnienie cytochromu c z mitochondriów do cytosolu, co w konsekwencji prowadziło do indukcji apoptozy (Majumder i wsp., 2000; Majumder i wsp., 2001). Podobne zjawisko obserwowano, gdy keratynocyty *in vitro* wystawione były na promieniowanie UV. Nastęstwem translokacji PKC δ do mitochondriów było kolejno: zaburzenie potencjału błonowego tych organelli, aktywacja kaskady kaspaz i śmierć komórki (Denning i wsp., 2002). Ciekawy wydaje się również fakt, iż nadekspresja PKC δ prowadzi do apoptozy zarówno keranocytów zdrowych jak i nowotworowych (Li i wsp., 1999).

Choć uważa się, że PKC δ jest głównie związana z apoptozą, istnieją doniesienia mówiące o jej udziale w kardioprotekcji. W kardiomiocytach szczurów poddanych krótkotrwałej, nie uszkadzającej ischemii i reperfuzji wykazano przemieszczanie PKC δ do mitochondriów, gdzie w wewnętrznej błonie oddziaływała z kanałem potasowym zależnym od ATP (mitoK_{ATP}), efektem czego była jego aktywacja prowadząca do kardioprotekcji (Uecker i wsp., 2003).

Wiele badań wskazuje, że translokacja niezależnej od Ca^{2+} PKC ϵ do mitochondriów ma bezpośredni związek ze zjawiskiem hartowania mięśnia sercowego (Inagaki i wsp., 2003). Krótkotrwały, nie uszkadzający komórki epizod niedokrwienności serca inicjuje wewnątrzkomórkową kaskadę sygnałów, które zwiększają odporność komórek na długotrwałe niedotlenienie, w konsekwencji, czego nie dochodzi do aż tak dużej utraty kardiomiocytów jak w komórkach serca nie poddanych wcześniejszemu hartowaniu ischemicznemu (Halestrap i wsp., 2007). Liczne prace, na modelach *in vitro*, *ex vitro* oraz *in vivo* pokazują, że selektywna aktywacja PKC ϵ prowadzi do kardioprotekcji (Budasz i wsp., 2007). Dodatkowo dane te potwierdzają doświadczenia z

zastosowaniem chlorku cheleritryny - inhibitora izoform PKC, w których nie obserwuje się zjawiska protekcji indukowanego przez krótkotrwały epizod niedokrwienny.

1.8 Mitochondrialni „partnerzy” białkowi kinazy białkowej C

Większość doniesień wskazuje na uwalnianie cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytosolu, jako następstwo licznych szlaków sygnałowych przebiegających w mitochondriach, a związanych z uszkodzeniem komórki. Nie jest w pełni jasne jak dochodzi do uwalniania cytochromu c oraz jakie białka mogą uczestniczyć w tym procesie i jaka jest rola kinaz białkowych w tym zjawisku (Kroemer i wsp., 2007). Metodą immunoprecypitacji mitochondriów wyizolowanych z komórek HeLa wykazano, że PKC δ współwystępuje z izoformą 3 skramblazy fosfolipidów (PLSCR3) (He i wsp., 2007), enzymem odpowiedzialnym za prawidłowe rozmieszczenie fosfolipidów (w tym charakterystycznej dla mitochondriów kardiolipiny (CL)) w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Van i wsp., 2007). PLSCR3 jest enzymem niezbędnym do nadania prawidłowej struktury lipidowej błon mitochondrialnych. Badania *in vitro* wykazały, że PLSCR3 jest fosforylowana przez PKC δ , konsekwencją, czego jest zmiana aktywności skramblazy, translokacja CL do zewnętrznej błony mitochondrialnej, gdzie wydaje się oddziaływać z białkiem proapoptotycznym tBID. Nastęstwem tej kaskady sygnałowej prowadzącej do uprzepuszczelnienia błony mitochondrialnej jest uwolnienie cytochromu c z mitochondriów (Liu i wsp., 2003a; Liu i wsp., 2003b). Jednocześnie, w czasie apoptozy, wykazano znaczny przyrost CL w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, podczas gdy w fizjologicznych warunkach fosfolipid ten występuje głównie po wewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej (Liu i wsp., 2003b). Badania te potwierdzają hipotezę przemieszczenia kardiolipiny w błonach mitochondrialnych przy udziale ufosforylowanej przez PKC δ i aktywnej PLSCR3 w procesie apoptozy (Liu i wsp., 2004).

W badaniach nad skutkami hartowania ischemicznego sugerowanych jest kilka białek mitochondrialnych, które mogą być substratami/białkami oddziałującymi z PKC ϵ . Należą do nich białka łańcucha oddechowego oraz białka kanałów jonowych (Budasz i Mochly-Rosen, 2007). W badaniach *in vitro* wykazano, że aktywacja kardiomiocytów izolowanych z zarodków szczurów aktywatorem PKC, PMA, prowadzi do fosforylacji podjednostki IV oksydazy cytochromowej (COXIV), natomiast podanie selektywnego inhibitora PKC ϵ , ϵ V1-2, hamuje tę fosforylację (Ogbi i wsp., 2004). Dalsze badania dowodzą, że poddanie hipoksyjnemu hartowaniu płodowych kardiomiocytów myszy,

indukuje koimmunoprecypitację PKC ϵ i COXIV. Rezultatem tych oddziaływań jest fosforylacja COXIV i obserwowany, aż czterokrotny wzrost aktywności oksydazy cytochromowej, wzmożona synteza ATP, tym samym usprawnienie funkcji bioenergetycznej mitochondriów, co tłumaczyć może zwiększoną odporność na uszkodzenie ischemiczne serca (Ogbi i Johnson, 2006).

Innym substratem PKC ϵ wydają się być białka tworzące MPTP: VDAC (*voltage-dependent anion channel*) w zewnętrznej oraz ANT (*adenine nucleotide translocator*) w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Metodą immunoprecypitacji udowodniono, że PKC ϵ łączy się z białkami ANT i VDAC, które ulegają fosforylacji (Baines i wsp., 2003). Wydaje się, że w prawidłowo funkcjonującej komórce, nie poddanej żadnemu stresowi, megakanał jest zamknięty lub minimalnie otwarty. Całkowite otwarcie MPTP podczas reperfuzji poniedokrwiennej prowadzi do śmierci komórki (Halestrap i wsp., 2002). Zaobserwowano, że inkubacja mitochondriów wyizolowanych z serca myszy z nadekspresją PKC ϵ obniżała otwarcie megakanału w warunkach niedotlenienia, a jego całkowite hamowanie miało miejsce w mitochondriach serca myszy z konstytutywnie aktywną PKC ϵ (Baines i wsp., 2003). Badania te sugerują udział PKC ϵ w regulacji aktywności megakanału i jego otwarcia.

Innym kanałem zlokalizowanym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, który prawdopodobnie oddziałuje z PKC ϵ , jest kanał potasowy, którego otwarcie regulowane jest przez ATP (mitoK_{ATP}). W stanie spoczynku, kiedy utrzymany jest stały poziom ATP w komórce, kanał ten jest zamknięty (Szewczyk i Wojtczak, 2002). Jego otwarcie poprzedzone jest obniżeniem ilości ATP, obserwowanym np. podczas niedokrwienia. Liczne doświadczenia wskazują, że krótkotrwałe otwarcie kanału mitoK_{ATP} wpływa na regulację objętości macierzy, na poziom Ca²⁺ w mitochondriach i produkcję wolnych rodników (Otani, 2004; Bednarczyk i wsp., 2005). Zaobserwowano, że kanał mitoK_{ATP} otwiera się po podaniu agonisty PKC ϵ - $\psi\epsilon$ RACK, a zamyka po podaniu antagonisty, ϵ V1-2 (Jaburek i wsp., 2006).

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

W wyniku wielu lat badań wydaje się, że istotnym elementem przekazywania sygnału ischemicznego prowadzącego do opóźnionej śmierci neuronów lub regeneracji po przebytych epizodzie niedokrwiennym jest przemieszczanie się pomiędzy przedziałami komórkowymi wielu białek, które w zależności od lokalizacji i współpartnerów mogą pełnić różne funkcje. Z badań wynika, że mitochondria integrują wewnątrzkomórkowe sygnały zapoczątkowane niedokrwieniem i bezpośrednio wpływają na losy komórek zwiększając ich szansę na przeżycie i regenerację lub rozpoczynając ścieżkę prowadzącą do śmierci.

Mimo rozległej wiedzy o procesach poniedokrwiennych w mózgu nie ma informacji na temat potencjalnych oddziaływań kinazy białkowej C z mitochondriami. Badania *in vitro* na komórkach nowotworowych pokazują, że PKC δ oddziałuje z mitochondrialnym enzymem skramblazą fosfolipidów (PLSCR3), który uczestniczy w utrzymaniu homeostazy białkowo-lipidowej błon mitochondrialnych, ale też może brać udział w uwalnianiu białek proapoptotycznych (Liu i wsp., 2003a). W dostępnym piśmiennictwie nie ma danych o ekspresji PLSCR3 w mózgu. Izoforma PKC ϵ związana z mitochondriami wydaje się uczestniczyć w hartowaniu ischemicznym serca (Budasz i Mochly-Rosen, 2007). W modelu poniedokrwiennych śmierci neuronów w mózgu myszokoczka różna wrażliwość sektorów hipokampa na krótkotrwałe niedokrwienie może sugerować udział kinaz białkowych C zarówno w procesach prowadzących do eliminacji neuronów jak i w endogennej neuroprotekcji.

Zatem celem badań było:

1. Sprawdzenie, jakie izoformy kinazy białkowej C przemieszczają się do mitochondriów pod wpływem 5 minutowej ischemii i reperfuzji mózgu myszokoczka mongolskiego (*Meriones unguiculaus*).
2. Zbadanie, czy zmiany poziomu immunoreaktywności wybranych izoform PKC w mitochondriach zależą od rejonu hipokampa (CA1 – rejon wrażliwy na niedokrwienie w porównaniu z CA2-4, DG – rejonami niewrażliwymi na krótkotrwały epizod ischemiczny).
3. Zweryfikowanie hipotezy, że PKC δ oddziałuje ze skramblazą fosfolipidów w CA1 hipokampa myszokoczka mongolskiego.
4. Zweryfikowanie hipotezy, że PKC β może oddziaływać z mitochondrialnymi kanałami potasowymi w mózgu myszokoczka.
5. Poszukiwanie białek mitochondrialnych oddziałujących z PKC β I.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Materiał badawczy

- Myszokoczki mongolskie (*Meriones unguiculatus*)
- Oseski oraz dorosłe szczury szczepu Wistar cmd
- Myszy C-57
- Komórki ludzkie Jurkat

Wszystkie zwierzęta pochodziły ze Zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN. Komórki Jurkat otrzymano z Pracowni Metabolizmu Komórki IBD im. M. Nenckiego.

3.2 Odczynniki

Płodowa surowica bydłęca (*ang. fetal bovine serum, FBS*)

Surowica końska (*ang. horse serum, HS*)

Surowica kozia (*ang. normal goat serum, NGS*)

Surowica ośła (*ang. normal donkey serum, NDS*)

Modyfied Lowry Protein Assay Kit do ilościowego oznaczania białka (Pierce)

SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate do detekcji białka sprzężonego z peroksydazą chrzanową HRP (Pierce)

Seize X Protein A Immunoprecipitation Kit do reakcji immunoprecypitacji (Pierce)

SilverSNAP Stain Kit II do srebrzenia żeli poliakrylamidowych (Pierce)

SuperScript II Reverse Transcriptase do reakcji odwrotnej transkrypcji (Invitrogen)

RNeasy Lipid Tissue Mini Kit do izolacji RNA z tkanki (Qiagen)

MiniElute Gel Extraction Kit do oczyszczania DNA wycinanego z żelu (Qiagen)

Pozostałe odczynniki zakupione były w firmach Sigma, Aldrich lub Merck.

3.3 Skład buforów i roztworów użytych do doświadczeń

Tabela 1. Zestawienie najczęściej stosowanych buforów i roztworów

Bufory i media	Skład
Bufor do otrzymywania frakcji komórkowych w tym mitochondriów (BH)	15 mM Tris/HCl (pH 7,6), 0,25 M sacharoza, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 1 mM PMSF; w celu wyizolowania czystych mitochondriów z frakcji wzbogaconej w mitochondria (P2) stosuje się 12% ficoll w w/w buforze
Bufor do lizy mitochondriów (immunoprecypitacja) (LB1)	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% NP-40, 1 mM PMSF, koktajl inhibitorów proteaz (1:200, Sigma)
Bufor do lizy mitochondriów („pull-down“) (LB2)	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1% Triton X-100, 0,5% NP-40, 1 mM PMSF, 0,1 mM CaCl ₂ , koktajl inhibitorów proteaz (1:200, Sigma)
Bufor do elektroforezy SDS-PAGE	25 mM Tris (pH 8,3), 192 mM glicyna, 0,1 % SDS
Bufor obciążający do elektroforezy SDS-PAGE (SB)	1 M Tris-HCl (pH 6,8), 87% glicerol, 10 g SDS, 0,1% BPB (błękit bromofenolowy) + 50 µl merkaptioetanolu/1 ml
Bufor do elektrotransferu	25 mM Tris (pH 8,3), 192 mM glicyna, 20% metanol, 0,01 % SDS
Bufor do Western Blot (TBST)	5 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,05% Tween20
Bufory do odmywania przeciwciał po reakcji WB	<i>przeciwciała I¹</i> : 0,1 M glicyna (pH 2,9) <i>przeciwciała I²</i> : 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM merkaptioetanol
Bufor do przechowywania skrawków pływających do immunohistochemii	10 mM bufor fosforanowy, 30% glikol etylenowy, 30% glicerol
Pożywka do hodowli organotypowych	<i>Zawierająca surowicę</i> : 50% DMEM, 25% HBSS, 25% surowica końska, 5 mg/ml glukozy, 1% Amphoterycyna B (fungizyna), 0,4% penicylina/streptomycyna, 1% B-27, 1 M Hepes <i>Bez surowicy</i> : 50% DMEM F-12, 50% HBSS, 5 mg/ml glukozy, 1% Amphoterycyna B (fungizyna), 1% N-2, 1% B-27, 0,4% penicylina/streptomycyna, 1 M Hepes

3.4 Modele badawcze

Wszystkie procedury doświadczeń przeprowadzanych na zwierzętach były wykonywane zgodnie z zaleceniami IV Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz z najwyższą troską i staraniem się o jak najmniejsze zadawanie bólu zwierzęciu zarówno przed, jak i po operacji oraz w czasie wykonywania perfuzji i eutanazji poprzez dekapitację.

3.4.1 Globalna ischemia przodomózgowia myszokoczka mongolskiego

Krótkotrwałe niedokrwienie mózgu myszokoczka mongolskiego wywoływane było poprzez 5 minutowe zaciśnięcie tętnic szyjnych wspólnych zaciskami naczyniowymi (Fine Science Tools). Przejściowe niedokrwienie mózgu myszokoczka jest przykładem fenomenu, gdzie obserwuje się wybiórcze uszkodzenie rejonu CA1 hipokampa i tzw. opóźnioną śmierć neuronów w tym obszarze mózgu. Charakterystyczna, ale zarazem unikatowa dla tego gatunku niepełna pętla Willisa sprawia, że zaciśnięcie dwóch tętnic szyjnych wspólnych wystarcza do całkowitego zablokowania dopływu krwi do mózgu i wywołania globalnej ischemii. Do doświadczeń użyto młodych, zdrowych, 3 miesięcznych



Myszokoczek mongolski

zwierząt ważących przeciętnie 60-70 g. Operacja trwająca maksymalnie 15 minut wykonywana była w pełnym znieczuleniu ogólnym przy wziewnym podawaniu 3% halotanu i gazów anestetycznych: podtlenku azotu (70%) i tlenu (30%). Podczas ischemii (po zaciśnięciu na 5 min tętnic) zmniejszano ilość halotanu do 1%. Przed wybudzeniem, podawano penicylinę bezpośrednio na ranę. W zależności od potrzeb doświadczenia

czas przeżycia zwierzęcia od chwili przywrócenia krążenia (repertuzja) wynosił 30 min, 1, 3, 24, 48, 72 lub 96 godzin. Zwierzęta kontrolne poddawane były jedynie zabiegowi znieczulenia i wypreparowania tętnic szyjnych, bez ich zaciskania.

W odpowiednim czasie po niedokrwieniu zwierzęta w narkozie halotanowej dekapitowano, preparowano mózg, z którego następnie izolowano hipokampy (w zależności od potrzeb dalszego doświadczenia izolowano całą strukturę lub dzielono ją na część grzbietową (CA1) i brzuszna (CA2-4, DG)).

3.4.1.1 Izolacja mitochondriów z hipokampów myszokoczka mongolskiego

Całą procedurę izolacji mitochondriów prowadzono w lodzie. Całe hipokampy lub ich fragmenty homogenizowano w buforze izotonicznym (BH) przy użyciu homogenizatora szkło-teflon, a następnie wirowano z przyspieszeniem 1000 x g przez 10 minut w 4°C w celu odrzucenia osadu zawierającego fragmenty niehomogenizowanej tkanki i jądra komórkowe. Nadsącz wirowano 11 000 x g (20 minut, 4°C) otrzymując osad wzbogacony we frakcję mitochondrialną (P2). Nadsącz (S2) zawierający białka cytosolowe mrożono. Osad zawieszano w BH i nanoszono na 12% ficoll w celu odseparowania mitochondriów od pozostałych błon komórkowych (siateczki śródplazmatycznej, błony plazmatycznej, aparatu Golgiego i pęcherzyków synaptycznych),

a następnie wirowano w ultrawirówce 100 000 x g (30 min, 4 °C). Osad zawierający czyste i aktywne fizjologicznie mitochondria zawieszano w BH i mrożono w -70°C lub bezpośrednio używano do dalszych analiz.

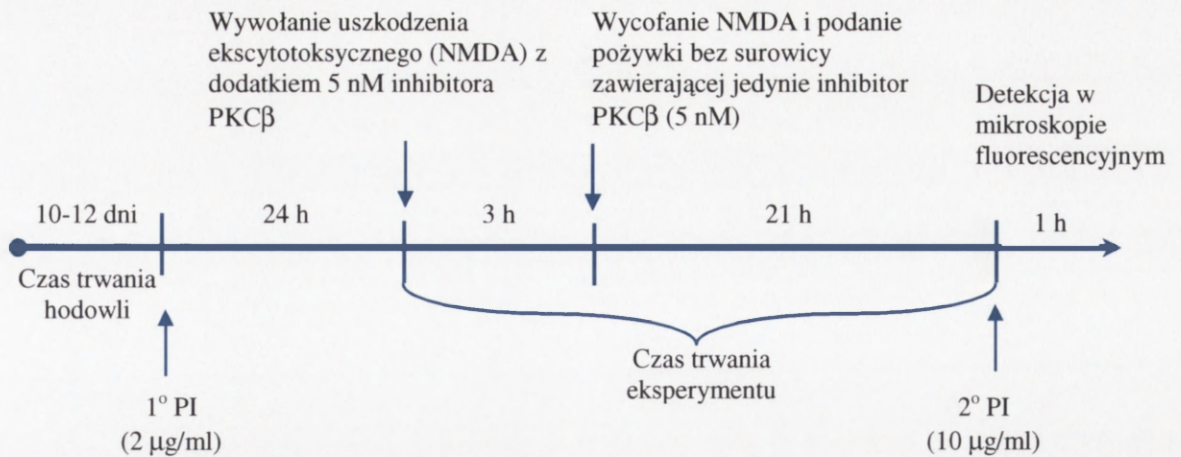
3.4.2 Hodowla organotypowa skrawków hipokampa szczura

3.4.2.1 Zakładanie i przebieg hodowli

Hodowlę organotypową zakładano z hipokampów 6 dniowych osesków szczura szczepu Wistar. Hipokampy izolowano według metody Stoppiniego, zmodyfikowanej przez dr Annę Sarnowską z Zakładu Neurobiologii Naprawczej w IMDiK PAN (Sarnowska, 2002). Oseski usypiano Vetbutalem, a następnie dekapitowano i izolowano hipokampy, które cięto na skrawki grubości 400 μm (McIlwain Tissue Chopper). Skrawki przechodziły wstępną selekcję pod mikroskopem świetlnym (Zeiss), z pociętych wybierano te z zachowaną i nieuszkodzoną mechanicznie strukturą CA1, CA2-4, DG. Skrawki umieszczano po cztery na membranie Millicell-CM (Millipore) o średnicy porów 0,4 μm , a te wkładano w szalki 6-dołkowe (Nunc), na dnie, których znajdowała się pożywka hodowlana, zawierająca surowicę końską (HS, Gibco), składniki niezbędne do wzrostu komórek, antybiotyki i związek przeciwrzybiczy (Tabela 1, strona 25). Stopniowo, z każdym kolejnym dniem hodowli wycofywano po części surowicę z pożywki, 5 dnia pożywka hodowlana nie zawierała surowicy. Hodowla prowadzona była przez 10 dni w temperaturze 37°C, w obecności 5% CO₂, wilgotność wynosiła 90%. 10 dnia rozpoczynano doświadczenie.

3.4.2.2 Ekscytotoksyczne uszkodzenie neuronów hipokampa *in vitro*

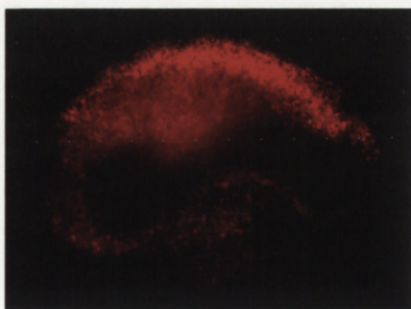
Stres inicjowany był podaniem do medium hodowlanego ekscytotoksycznej dawki NMDA (*N-metylo-D-asparagianu*) (100 μM NMDA) – analogu glutaminianu, aktywatora receptorów NMDA związanych z kanałami jonowymi przepuszczalnymi dla jonów wapnia, sodu i potasu. Eksperymentalnie ustalono, że 3-godzinna ekspozycja na 100 μM NMDA wywołuje uszkodzenie neuronów pola CA1 hipokampa, które będzie możliwe do zaobserwowania i oszacowania po 24 godzinach. W celu sprawdzenia skutku hamowania PKC β na przeżycie neuronów hipokampa stosowano selektywny inhibitor PKC β (IC₅₀ = 5 nM) peptyd: 3-(1-(3-Imidazol-1-ylpropyl)-1H-indol-3-yl)-4-anilino-1H-pyrrole-2,5-dion. Na Rycinie 2 przedstawiony został schemat przeprowadzanego doświadczenia.



Ryc.2 Schemat badania uszkodzenia obszarów hipokampa szczura po podaniu inhibitora PKC β , *in vitro*. Do 10-12 dniowej hodowli, na 24 godziny przed eksperymentem, dodawano jodek propidyny (1° PI) i przeprowadzano wstępną ocenę skrawków w mikroskopie fluorescencyjnym. Po usunięciu PI, wraz ze świeżą pożywką dodawano czynnik indukujący ekscytotoksyczność - 100 μ M NMDA, który usuwano po 3 godzinach oraz inhibitor PKC β , który był obecny w pożywce do końca doświadczenia. Obserwację końcową prowadzono po 24 godzinach od rozpoczęcia eksperymentu, po uprzednim dodaniu 2° PI.

3.4.2.3 Określanie przeżycia skrawków hipokampa szczura metodą barwienia jodkiem propidyny

Jodek propidyny (PI) jest związkiem oddziałującym z jądrowym DNA emitując czerwone światło fluorescencji (Ryc. 3). Dzięki temu, że przenika jedynie przez błony komórek martwych (z żywych jest aktywnie wypompowywany) jest ich doskonałym markerem. W zależności od etapu doświadczenia PI dodawano w dwóch różnych stężeniach: 2 μ M (przez 24 h) – dla wstępnej detekcji i eliminacji martwych skrawków hipokampa przed wykonaniem właściwego doświadczeniem oraz 10 μ M (przez 1 h) – dla sprawdzenia efektu, jaki wywołało podanie NMDA oraz substancji badanej w porównaniu ze skrawkami kontrolnymi.



Ryc.3 Przykładowy obraz barwienia PI (10 μ M) komórek skrawka hipokampa szczura po podaniu 100 μ M NMDA. Górny, najbardziej jaskrawy obszar w kształcie półksiężyca, odpowiada obszarowi CA1. Zdjęcie wykonano przy użyciu kamery Axio Vision w mikroskopie fluorescencyjnym.

3.4.2.4 Analiza wyników

Zdjęcia wykonano w mikroskopie fluorescencyjnym Carl Zeiss przy użyciu kamery i programu Axio Vision 5 po 24 h od podania NMDA. Następnie zliczano piksele świecące na kolor czerwony (PI) odpowiadające liczbowo martwym komórkom i za pomocą programu Koroner ver. 1.1. (dzięki uprzejmości dr Anny Sarnowskiej i Pawła Potrzebowski) obliczano procent komórek martwych (pozytywnych w jodku propidyny) za pomocą wzoru:

$$\% \text{ komórek pozytywnych PI} = (FI/\text{max FI}) \times 100\%$$

gdzie: FI odpowiadało intensywności świecenia skrawka badanego, a max FI - intensywności świecenia skrawków, którym podano 1mM NMDA powodując całkowite uszkodzenie struktury komórek hipokampa.

3.5 Badania elektrofizjologiczne

3.5.1 Otrzymywanie mitoplastów

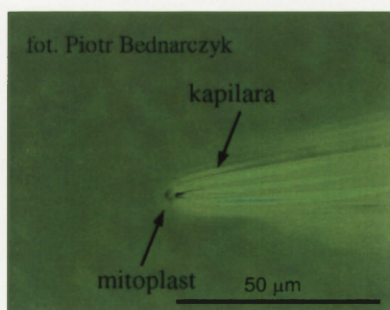
Mitoplasty otrzymywano ze świeżo wyizolowanych (metodą opisaną w rozdziale 3.4.1.1.) mitochondriów hipokampa kontrolnego myszokoczka. Pobierano 1 μl zawiesiny mitochondriów (zawieszonych uprzednio w buforze BH) i poddawano je pęcznieniu (szokowi osmotycznemu) przenosząc do roztworu hipotonicznego (Tabela 2). W wyniku różnicy ciśnień następowało pęcznienie mitochondriów i pęknięcie ich zewnętrznej błony, przy zachowaniu błony wewnętrznej – otrzymywano tzw. mitoplasty, które następnie poddawano analizie elektrofizjologicznej.

Tabela 2. Skład buforów w badaniach elektrofizjologicznych

Bufor	Bufory i media
Izotoniczny bufor podstawowy	150 mM KCl, 10 mM Hepes, 0,2 mM CaCl ₂ , pH 7,2
Bufor hipotoniczny	5 mM Hepes, 100 μM CaCl ₂ , pH 7,2
Bufor hipertoniczny	750 KCl, 30 mM Hepes, 100 μM CaCl ₂ , pH 7,2
Bufor w układzie różnicy stężeń	50/150 mM KCl, 20 mM Hepes, 100 mM CaCl ₂ , pH 7,2
Bufor w układzie stężeń symetrycznych	150/150 mM KCl, 20 mM Hepes-KOH, 100 μM CaCl ₂ , pH 7,2

3.5.2 Technika patch-clamp

Doświadczenia elektrofizjologiczne przeprowadzono w Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN pod opieką dr Piotra Bednarczyka. W pracy wykorzystano technikę elektrofizjologiczną, pozwalającą na rejestrację prądów jonowych płynących przez pojedyncze białka kanałowe - metodę patch-clamp w konfiguracji oderwanej łątki. Z mieszaniny otrzymanych mitoplastów wybierano pęcherzyk, który po lekkim zassaniu szklaną kapilarą (pipetą) tworzył ścisłe połączenie pomiędzy końcówką pipety, a błoną mitoplastu (Ryc. 4). Pipeta wypełniona była podstawowym roztworem izotonicznym (150 mM KCl, 10 mM Hepes, 100 mM CaCl₂, pH 7,2), który modyfikowano dla potrzeb kolejnych analiz i badanych związków (Tabela 2, strona 29). Podczas próby identyfikacji mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie aktywowanego/otwieranego jonami wapnia (wrażliwego już na bardzo niskie stężenia tych jonów, mitoBK_{Ca}) oraz kanału potasowego regulowanego przez ATP (mitoK_{ATP}) do buforu w układzie symetrycznych stężeń dodawano kolejno wapń o zmniejszonym stężeniu (1 μM Ca²⁺) oraz ATP z Mg²⁺ w stężeniu 1mM. Margatoksyna, agitoksyna-2 i kompleks ATP/Mg²⁺ dodawane były w roztworze izotonicznym. Wszystkie przeprowadzone doświadczenia wykonane były w temperaturze pokojowej, w systemie oderwanej łątki, gdzie złącze miało dużą oporność około 1,2 GΩ. Rejestracje prowadzono przy pomocy wzmacniacza Axopatch 200B (Molecular Devices, USA), a analizy prowadzono wykorzystując program Clampex 10 (Molecular Devices, USA).



Ryc.4 Obraz z mikroskopu kontrastowo-fazowego przedstawiający mitoplast przytwierdzony do szklanej kapilary; zdjęcie wykonano w Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie.

3.6 Badania molekularne

3.6.1 Analiza ekspresji PLSCR3 na poziomie mRNA

3.6.1.1 Projektowanie starterów

Genom myszokoczka mongolskiego nie został do tej pory zsekwencjonowany, dlatego startery do reakcji PCR zaprojektowano posługując się sekwencjami genu PLSCR3

innych gatunków zwierząt. Wykorzystano program ClustalW Sequence Alignment (porównanie sekwencji mRNA) oraz Primer 3 (projektowanie starterów) – w obydwu porównywano sekwencję genu *PLSCR3* człowieka, psa, wołu, szczura, myszy i żaby wybierając fragment genu najbardziej zbliżony pod względem sekwencji dla wszystkich analizowanych gatunków i na tej podstawie zaprojektowano jeden starter zdegenerowany, a drugi klasyczny oparty o sekwencje konserwowaną we wszystkich badanych gatunkach. Startery dla referencyjnego genu *GAPDH* posłużyły, jako kontrola poprawnie przeprowadzonej reakcji PCR (Tabela 3, 4).

Tabela 3. Sekwencje starterów do badania ekspresji *PLSCR3* w mózgu gryzoni:

<i>PLSCR3</i> 5' (zdegenerowany)*:	5' CTGGGTCAGGCRGCBGARGAGAGCARCT
<i>PLSCR3</i> 3':	5' TGCCAGGTCTGTAGCAC
<i>GAPDH</i> 5':	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA
<i>GAPDH</i> 3':	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC

*Stosując tabelę kodu IUPAC (Tabela 4) skonstruowano lewy zdegenerowany starter (tzw. nieodpowiadający) dla genu *PLSCR3*.

Tabela 4. Odpowiedniki zasad dla starterów zdegenerowanych (nieodpowiadających)

Kod IUPAC	Nukleotyd w sekwencji
A	Adenina
C	Cytozyna
G	Guanina
T	Tymina
R	puryny: A lub G
Y	pirymidyny (C lub T)
M	C lub A
K	T lub G
W	T lub A
S	C lub G
B	C lub T lub G
D	A lub T lub G
H	A lub C lub T
V	A lub C lub G
N	A lub C lub G lub T

Wszystkie startery używane do amplifikacji sekwencji kodujących genu *PLSCR3* i *GAPDH* wykonano w syntetyzerze MJ Research PTC 200 w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN.

3.6.1.2 Izolacja RNA z tkanek

Z hipokampa i śledziony myszokoczka oraz z kory mózgu myszy izolowano RNA przy użyciu zestawu RNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen). Procedurę otrzymywania RNA z 30 mg tkanki wykonywano według przepisu i zaleceń producenta z zachowaniem sterylności oraz z używaniem roztworów pozbawionych DNaz i RNaz. Spektrofotometryczny pomiar stężenia RNA wykonywano przy użyciu aparatu Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech). Osad RNA zawieszano w sterylnej wodzie. Stężenie i czystość preparatów RNA oznaczano spektrofotometrycznie mierząc gęstość optyczną przy długości fali 260 i 280 nm w spektrofotometrze Ultrospec 2000 UV/Visible (Amersham Pharmacia Biotech) wykorzystując zasadę, że $OD_{260} = 1$ odpowiada ok. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA, a $OD_{260}/OD_{280} = 2$ oznacza czysty preparat RNA. Do reakcji RT-PCR stosowano preparaty RNA, których OD_{260}/OD_{280} był większy niż 1,7.

3.6.1.3 Badanie ekspresji wybranych genów

a) Synteza cDNA na matrycy całkowitego RNA

Do reakcji syntezy cDNA użyto RNA wyizolowanego z kory mózgu myszy, hipokampa i śledziony myszokoczka. Do reakcji odwrotnej transkrypcji używano 2 μg RNA i zestawu odczynników Invitrogen: 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ *random primers*, 5 x *First Strand Buffer*, 0,1M DTT, Super Script II oraz 10 mM dNTP (Fermentas). Reakcje prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta.

b) Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Reakcje przeprowadzano w termocyklerze (Biometra), w cienkościennych probówkach typu eppendorf o objętości 0,2 ml.

Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Objętość [μl]
cDNA	4
10 x PCR bufor (Fermentas)	2,5
10 mM dNTP (Fermentas)	0,5
25 mM MgCl_2 (Fermentas)	1,5
10 pmol starter F (forward)	1
10 pmol starter R (reverse)	1
Taq DNA polimerazy (Fermentas)	1
H_2O	13,5

Każdą z reakcji amplifikacji, do której użyto cDNA otrzymane z mózgu szczura i myszy oraz z mózgu i śledziony myszokoczka przeprowadzono w objętości 25 μ l w warunkach dobranych dla starterów. W badaniach ekspresji PLSCR3 w efekcie licznych prób dobrano profil termiczny dla reakcji typu touch-down PCR, czyli takiej jej modyfikacji gdzie temperatura przyłączania starterów ulega obniżeniu z każdym kolejnym cyklem. Jest to typowy rodzaj PCR stosowany przy używaniu starterów zdegenerowanych, dla których nie można określić optymalnej temperatury topnienia. Profil termiczny PCR typu „touch-down”: liczba cykli: 30, zakres temperatur przyłączania starterów: $T_m^{\circ} = 70-56^{\circ}\text{C}$. W przypadku amplifikacji GAPDH reakcje przyłączania starterów prowadzono w 58°C .

3.6.1.4 Elektroforeza w żelu agarozowym

Rozdział produktów reakcji RT-PCR prowadzono w 1% żelu agarozowym w buforze 1 x TE. Otrzymane w wyniku reakcji PCR próbki w objętości 10 μ l każda, nakładano na żel z dodatkiem 2-3 μ l buforu obciążającego. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze 1 x TBE przy stałym napięciu 65 V przez około 30 minut. Żel oświetlano światłem ultrafioletowym i obraz zapisywano przy użyciu kamery CCD.

3.6.1.5 Oczyszczanie produktu PCR i sekwencjonowanie

Produkty PCR wycinano z żelu i oczyszczano przy użyciu zestawu MiniElute Gel Extraction Kit (Qiagen) ściśle według zaleceń i przepisu producenta. Tak przygotowaną próbkę sekwencjonowano w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

3.6.2 Analiza na poziomie białka

3.6.2.1 Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka w próbach mitochondriów izolowanych z mózgu (3.4.1.1) oznaczano stosując zestaw Pierce oparty na zmodyfikowanej metodzie Lowry (Lowry i wsp., 1951) przy zastosowaniu aparatu Microplate Reader Model 680 (Bio-Rad), a następnie wyliczano stężenie białka w 1 μ l próbki.

3.6.2.2 Immunodetekcja z zastosowaniem metody Western Blot (WB)

- a) Elektroforeza SDS-PAGE i elektrotransfer

Elektroforezę w żelu poliakrylamidowym przeprowadzano w 4% żelu zatężającym i 10% żelu rozdzielającym. Do badanych próbek o określonym stężeniu białka (10-30 μg) dodawano odpowiednie objętości 2 lub 5 x stężonego buforu SB o właściwościach denaturujących, próbki gotowano w temperaturze 100°C przez 5 minut, a następnie schładzano w lodzie. Tak przygotowane próbki oraz marker wielkości (Low Range, Bio-Rad) w ilości 5 μl nanoszono do kieszonek elektroforetycznych w żelu rozdzielającym. Elektroforezę SDS-PAGE przeprowadzano w buforze 1 x TAE (Bio-Rad) przy napięciu 80/160 V przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej. Po elektroforezie, białka przenoszono na membrany nitrocelulozowe Hybond C-Extra (Amersham) o średnicy porów 0,4 μm w buforze do elektrotransferu (Tabela 1, strona 25). Czas trwania transferu wynosił 1,5 godziny przy natężeniu prądu 300 mA w 4°C. Następnie membrany suszono i przechowywano między bibułami w szczelnym pudełku lub poddawano analizie immunochemicznej.

b) Detekcja białek przy użyciu przeciwciał

Nitrocelulozy z białkami związanymi na jej powierzchni blokowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w 5% mleku z buforze TBST (Tabela 1, strona 25). Następnie przeprowadzano immunoreakcję stosując wybrane do danego doświadczenia przeciwciała pierwszorzędowe w odpowiednim dla każdego z nich stężeniu (Tabela 6). Inkubację prowadzono bądź w temperaturze 37°C przez 1h, w pokojowej przez 1,5-3h lub przez noc w 4°C. Następnie membrany intensywnie płukano w dużej objętości TBST 3 razy po 5 min. Inkubację z odpowiednim stężeniem przeciwciała drugorzędowego (Tabela 6) prowadzono w mieszaninie 5% mleka i TBST w objętości 20 ml przez 30 min w temperaturze pokojowej. Do detekcji wykorzystano metodę chemiluminescencji ECL stosując zestaw do immunodetekcji (Amersham).

Tabela 6. Charakterystyka przeciwciał użytych do analiz metodą Western Blot (WB). W tabeli umieszczono masy cząsteczkowe rozpoznawanych białek oraz warunki inkubacji z pierwszo- i drugo-rzędowymi przeciwciałami sprzężonymi z peroksydazą chrzanową w metodzie WB. o/n – inkubacja przez noc w temperaturze 4°C, RT – inkubacja w temperaturze pokojowej, h – czas inkubacji w godzinach.

Przeciwciało	Pochodzenie	Producent	ilość [μl] i warunki
PKC α (82 kDa)	monoklonalne	Tranduction Lab.	1:1000; 1,5h RT
PKC β (80 kDa)	monoklonalne	Tranduction Lab.	1:200; 1,5h RT
PKC γ (80 kDa)	monoklonalne	Tranduction Lab.	1:5000; 1h RT

Przeciwciało	Pochodzenie	Producent	ilość [μl] i warunki
PKC δ (78 kDa)	monoklonalne	Tranduction Lab.	1:250; 1,5h RT
PKC μ (115 kDa)	monoklonalne	Tranduction Lab.	1:250; 1,5h RT
Oksydaza cytochromowa CoxIV (19 kDa)	monoklonalne	Molecular Probes	1:1000; 1,5h R/T
Kadheryna (135 kDa)	poliklonalne królicze	Abcam	1:200; 1,5h 37°C
PSD 95 (95 kDa)	monoklonalne	Affinity BioReagents	1:1000; 2h 37°C
InsP3R (240 kDa)	poliklonalne królicze	Affinity BioReagents	1:1000; o/n 4°C
PLSCR3 (30 kDa)	monoklonalne poliklonalne królicze	Abcam Abnova	1:500; 1,5h 37°C
Kv1.3 (65 kDa)	poliklonalne królicze poliklonalne kozie	Alomone Santa Cruz	1:200; 2h RT 1:200; o/n 4°C
ANT (32 kDa)	poliklonalne kozie	Santa Cruz	1:250; 1h RT
VDAC (35 kDa)	poliklonalne kozie	Santa Cruz	1:500; 1h RT
Cytochrom c (15 kDa)	monoklonalne	BD Pharmingen	1:1000; 2h RT
Bid (20 + 15 kDa dla tBid)	Poliklonalne kozie	Santa Cruz	1:1000; o/n 4°C
II rządowe	mysie, monoklonalne	Sigma	1:5000; 0,5h RT; 5% mleko
II rządowe	królicze, poliklonalne	Sigma	1:8000; 0,5h RT; 5% mleko
II rządowe	kozie, poliklonalne	Santa Cruz	1:5000; 0,5h RT; 5% mleko

3.6.2.3 Metody badania oddziaływań białko-białko

3.6.2.3.1 Koimmunoprecypitacja

W celu odpowiedzi na pytanie czy białka PKC δ i PLSCR3 tworzą kompleks w mitochondriach zastosowano metodę immunoprecypitacji. Wzorowano się na metodzie opisanej wcześniej, modyfikując ją na potrzeby doświadczenia (Beresewicz i wsp., 2006). Do analizy użyto oczyszczonej frakcji mitochondrialnej P3 wyizolowanej z części CA1 hipokampa mózgu myszokoczka kontrolnego oraz po 96 godzinach reperfuzji po ischemii. 200 μg frakcji mitochondriów poddano ekstrakcji w buforze LB1 (Tabela 1, strona 25). Próbkę, której końcowa objętość wynosiła 600 μl dokładnie mieszano i inkubowano w lodzie przez 1 godzinę, delikatnie mieszając co 15 minut. Następnie wirowano 11 000 x g (20 minut, 4°C). Nadsącz łączono z 20 μl Sefarozy związanej z białkiem A (Sigma), którą uprzednio moczo przez dobę w buforze 0,14 M Na₂HPO₄ i inkubowano w lodzie przez 15 minut przeprowadzając tzw. „pre-cleaning” (wstępną fazę oczyszczania mieszaniny z białek niespecyficznie wiążących się ze złożem). Mieszaninę ponownie wirowano 11 000 x g (20 minut, 4°C). Do zebranego nadsączu dodano 15 μl świeżej Sefarozy A oraz 2 μl

przeciwciała rozpoznającego PKC δ lub PLSCR3 (tabela 7). Próbki inkubowano na mieszadle obrotowym (noc, 4°C). Wytworzone kompleksy (Sefaroza A + przeciwciało + białko) płukano trzy razy w buforze LB1, a potem wymywano (zbierano znad złoża) używając 60 μ l 5 x stężonego buforu SB w temp. 100°C. Kompleksy analizowano metodą Western Błot.

Tabela 7. Charakterystyka przeciwciał użytych do immunoprecypitacji (IP). W tabeli umieszczono masy cząsteczkowe rozpoznawanych białek oraz ilości przeciwciał użytych do immunoprecypitacji

Przeciwciało	Pochodzenie	Producent	ilość dla IP [μ l]
PKC δ (78 kDa)	poliklonalne	Santa Cruz	2 μ g:200 μ l białka
PLSCR3 (30 kDa)	monoklonalne poliklonalne	Abcam Abnova	2 μ g:200 μ l białka

3.6.2.3.2 Chromatografia typu „pull – down“

a) Sprzężanie rekombinowanej PKC β 1 z CNBr Sefarozą 4B

Rekombinowane białko izoformy PKC β 1 (Sigma) kowalencyjnie sprzężano z aktywowaną CNBr Sefarozą 4B (Fluka). Aktywowanie złoża polegało na zmieszaniu 1 mg Sefarozy z 15 ml dejonizowanej wody o pH 3,0. Po 10 minutach zawiesinę przenoszono na 0,22 μ m filtr butelkowy (Vacuum Driven Disposable Bottle Top Filter, Millipore) i płukano 1 l ciągłego strumienia wody dejonizowanej o pH 3,0, a następnie 60 ml roztworu zawierającego 0,4 M NaCl i 50 mM bufor boranowy o pH 8,2. Kolejno 17 μ g rekombinowanego białka PKC β 1 (10 μ l), zawieszono w 25 μ l aktywowanej CNBr Sefarozie i inkubowano na mieszadle obrotowym przez noc w 4°C. Złoże z połączonym kowalencyjnie białkiem umieszczano w kolumnie i kolejno płukano jedną objętością wody dejonizowanej i dwoma objętościami roztworu 0,13 M KCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5. Takie złoże zalewano buforem zabezpieczającym (0,02% NaN₃, 2 mM EDTA, 2 mM KCl, 40 mM Tris/HCl, pH 7,5) i przechowywano w temperaturze 4°C do czasu dalszych badań (procedura na podstawie metody opisanej w doktoracie M. Błażejczyk MIBMiK, zmodyfikowana dla potrzeb doświadczenia).

b) Chromatografia typu „pull – down“

Chromatografia „pull – down” jest kolejną metodą badania oddziaływań między białkami, która wykorzystuje powinowactwo między cząsteczkami. Zastosowano ją do identyfikacji białek mitochondrialnych, które mogłyby oddziaływać z kinazą PKC β 1. W

tym celu do doświadczenia użyto frakcji czystych mitochondriów wyizolowanych z hipokampa mózgu kontrolnego myszokoczka (metoda opisana w podrozdziale 3.4.1.1.). Frakcję P3 rozpuszczono w 500 μ l buforu LB2 (Tabela 1) (1 godzina, 4°C), a następnie wirowano 15 000 \times g (4°C, 30 minut). 500 μ l nadsączu zawierało około 300 μ g białka. 20 μ l mieszaniny zachowano, jako frakcję wyjściową – kontrolną względem białek wyselekcjonowanych z ekstraktu, a pozostałą objętość użyto do inkubacji (noc, 4°C) z Sefarozą CNBr sprzężoną z PKC β I (pobrano 45 μ l przygotowanego złoża, które uprzednio przepłukano dwukrotnie buforem LB2). Dodatkowo przeprowadzono dwa doświadczenia kontrolne, w jednym używając złoża nieaktywowanego, w drugim stosując aktywowane, lecz bez związanego z nim białka PKC β I. Po nocnej inkubacji zbierano z próbki frakcję niezwiązaną, a złoże (kompleks CNBr Sefaroza + PKC β I + przytwierdzone białka) płukano 3 x LB2. Aby wymyć białka ze złoża dodano 60 ml 5 x stężonego buforu SB i zagotowano próbki. Odpowiednie objętości poddano elektroforezie SDS-PAGE i srebrzeniu (procedura „pull – down” na podstawie metody opisane w doktoracie M. Błażejczyk MIBMiK, zmodyfikowana dla potrzeb doświadczenia).

3.6.2.4 Elektroforeza SDS-PAGE i srebrzenie białek do analizy metodą spektrometrii mas

Wszystkie roztwory filtrowano przez sącze o porach 0,22 μ m, włącznie ze składnikami, z których przygotowany był żel poliakrylamidowy do elektroforezy. Na żel nakładano próby białek mitochondrialnych oraz związanych z PKC β I z CNBr Sefarozą i prowadzono elektroforezę tak jak w paragrafie 3.6.2.2.a. Żel po elektroforezie płukano dejonizowaną wodą (2 x 5 minut), a następnie, by utwalić zawarte w nim białka, moczono w 30% etanolu i 10% kwasie octowym (2 x 15 minut). Kolejno żel płukano 2 x 5 min w 10% etanolu i w wodzie. Dalsze etapy (uwrażliwienie białek, srebrzenie i wywoływanie) wykonywano przy użyciu zestawu do srebrzenia SilverSNAP Stain Kit II (Pierce) stosując gotowe odczynniki ściśle według zaleceń producenta. Na koniec reakcję srebrzenia zatrzymywano roztworem 5% kwasu octowego (10-15 minut), żel utrwalano w 20% etanolu i 4% glicerolu (2 x 30 min). Żel skanowano, a następnie wycinano wybrane prążki białkowe i oddawano do analizy metodą spektrometrii mas (IBB PAN).

3.6.2.5 Precypitacja białek z roztworu

Białka wytrącano z 50 μ l próbki zawierającej ekstrakt białkowy mitochondriów związany z PKC β I (otrzymanej w wyniku chromatografii typu pull-down) stosując 4

objętości metanolu i 1 objętość chloroformu. Całość mieszano, a po dodaniu 3 objętości wody próbkę wirowano (2 min., 12 000 x g). Górną fazę odrzucano, nanoszono 3 objętości metanolu i ponownie wirowano. Po zebraniu płynnej frakcji, osad poddawano analizie identyfikacji białek w spektrometrze mas (IBB PAN).

3.6.2.6 Spektrometria mas

Identyfikacja białek przeprowadzona została w Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w spektrometrze MALDI.

3.6.3 Analiza na poziomie tkanki

3.6.3.1 Badania immunocytochemiczne i obrazowanie w mikroskopie elektronowym

a) Przygotowanie preparatów mózgów myszokoczków mongolskich do analizy w mikroskopie elektronowym

W znieczuleniu Vetbutalem myszokoczekki kontrolne oraz 96 godzin po 5 min niedokrwieniu mózgu były przezsercowo perfundowane 4% paraformaldehydem (PFA) rozpuszczonym w PBS. Z utrwalonych mózgów izolowano hipokampy i rozdzielano na dwa fragmenty zawierające rejon CA1 oraz CA2-CA3, DG, które dalej utrwalano przez noc w 4°C w 4% PMF w PBS. Dalsze procedury wykonywane były w temperaturze pokojowej. Skrawki przez 1 godzinę traktowano 1% czterotlenkiem osmu (OsO₄), a następnie odwadniano w gradiencie alkoholu etylowego (30-100%), przesycano w mieszaninie epon : tlenek propylenu w stosunku 1:1. Po 12-24 godzinach skrawki zatapiano w kapsułach eponu i poddawano polimeryzacji w 60°C. Następnie fragmenty mózgów cięto nożem diamentowym na ultra cienkie skrawki (ultramikrotom LKB-NOVA) gotowe do przeprowadzenia reakcji immunocytochemicznej.

b) Reakcje immunocytochemiczne i analiza ultrastrukturalna

Ultracienkie skrawki przeniesiono na siatki niklowe, a następnie inkubowano przez 10 minut w 10% wodzie utlenionej. Wyflukane w PBS preparaty blokowano w 0,1% BSA w PBS. Zastosowano podwójne znakowanie, przeciwciałami skierowanymi przeciwko białku PLSCR3 oraz PKC δ . Skrawki inkubowano przez noc w 4°C w PBS z poliklonalnym, króliczym przeciwciałem anti-PLSCR3 oraz monoklonalnym, mysim przeciwciałem anti-PKC δ (Tabela 8). Immunodetekcji dokonano przy użyciu mieszaniny drugorzędowych przeciwciał anti-królik i anti-mysz, które połączone były z kulkami złota różnej średnicy, odpowiadające kolejno 18 nm i 12 nm (Tabela 8). Po całonocnej inkubacji

w 4°C skrawki płukano w PBS. Kontrolę negatywną stanowiły skrawki, które w identycznej procedurze inkubowane były w buforze bez pierwszorzędowych przeciwciał i nie powinny znakować się kulkami złota. Po serii płukań w PBS i wodzie destylowanej skrawki były inkubowane z octanem uranylu i cytrynianem ołowiu w celu zabarwienia komórek. Preparaty analizowano i zdjęć dokonano przy użyciu mikroskopu elektronowego JEM 1011 (100 kV) w Pracowni Ultrastruktury Komórki, IMDiK PAN.

Tabela 8. Charakterystyka przeciwciał użytych do immunocytochemii ultrastrukturalnej (ICC).

Przeciwciało	Pochodzenie	Producent	rozcieńczenie do ICC
PKC δ	monoklonalne	Santa Cruz	1:30
PLSCR3	poliklonalne, królicze	Abcam	1:50
II rzędowe	mysie, monoklonalne	Sigma	1:50
II rzędowe	królicze, poliklonalne	Sigma	1:100

3.6.3.2 Badania immunohistochemiczne i obrazowanie w mikroskopie konfokalnym

a) Przygotowanie preparatów mózgów myszokoczków mongolskich do analizy w mikroskopie fluorescencyjnym

W znieczuleniu Vetbutalem kontrolne myszokoczki były przezsercowo perfundowane 4% PFA rozpuszczonym w PBS. Wyizolowane mózgi dodatkowo utrwalano w 4% PFA w PBS. Mózgi odsączano i umieszczano w 20% sacharozie (przez noc). Mózgi mrożono na suchym lodzie i umieszczano w -70°C, a następnie krojono na kriostacie. 40 μ M skrawki umieszczano po 4 w 24 dołkowej płytce wypełnionej buforem do przechowywania skrawków (Tabela 1). Tak przygotowaną płytkę umieszczano w -20°C przechowując do czasu barwienia.

b) Reakcje immunohistochemiczne na skrawkach „pływających”

Aby wykazać lokalizację komórkową białka kanału potasowego mitoKv1.3 przeprowadzono barwienia immunohistochemiczne.

Przygotowane odpowiednio skrawki po wyjęciu z -20°C delikatnie przenoszono do temperatury pokojowej na wypełnioną PBS płytkę 24 dołkową i trzykrotnie płukano w PBS (5 minut). Następnie inkubowano je w mieszaninie blokująco - permeabilizującej zawierającej 5% roztwór albuminy bydlęcej (BSA) rozpuszczonej w PBS z dodatkiem

0,25% Triton X-100 (60 minut). Skrawki inkubowano z koktajlem pierwszorzędowych przeciwciał rozcieńczonych w roztworze 2% BSA z dodatkiem 0,25% Triton X-100. Inkubację prowadzono przez noc w 4°C delikatnie wytrząsając. Szczegóły dotyczące stosowanych przeciwciał oraz ich stężeń zamieszczono w Tabeli 9. Po nocnej inkubacji skrawki płukano trzykrotnie przez 5 minut w PBS, a następnie inkubowano z mieszaniną przeciwciał drugorzędowych połączonych z Alexa Fluor 488 lub Alexa Fluor 546 (Invitrogen), które rozcieńczono 1:500 w PBS (60 minut w ciemności). Następnie skrawki płukano trzykrotnie w PBS przez 10 minut. Po ostatnim płukaniu barwiono jądra stosując Hoechst 33258 (Sigma) w stężeniu 5 μ M (10 minut w ciemności). Równolegle, specyficzność barwienia przeciwciałem sprawdzano poprzez inkubację skrawka dokładnie według metody opisanej powyżej, ale z pominięciem przeciwciała pierwszorzędowego. Trójkolorowo zabarwione skrawki naciągano na szkiełka podstawowe i zamykano szkiełkiem nakrywkowym. Preparaty oglądano i rejestrowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss). Korzystano z laserów: helowo-neonowego (do wzbudzania Alexa Fluor 546), argonowego (do wzbudzania Alexa 488) oraz diody 405 nm (do wzbudzania Hoechst 33258).

Tabela 9. Charakterystyka przeciwciał użytych do immunohistochemii (IHC). W tabeli umieszczono stężenia przeciwciał pierwszo- i drugo-rzędowych.

Przeciwciało	Pochodzenie	Producent	rozcieńczenie do IHC
Kv1.3	kozy, poliklonalne	Santa Cruz	1:75
COXIV podjednostka IV	monoklonalne	Molecular Probes	1:200
II rządowe	królicze,	Alexa Fluor Invitrogen	1:500
II rządowe	mysie, IgG _{2a}	Alexa Fluor Invitrogen	1:500
II rządowe	królicze, poliklonalne	Alexa Fluor Invitrogen	1:500

3.7 Metody analizy bioinformatycznej i statystycznej

3.7.1 Analiza densytometryczna i statystyczna wyników

Gęstość optyczną prążków otrzymanych w wyniku Western Blot analizowano densytometrycznie używając programu GelExpert 4 firmy NucleoTech (USA). Otrzymane dane liczbowe przedstawiono na wykresach jako procent kontrolnych wartości. Znając wartość odchylenia standardowego i liczebność próby badanej analizę statystyczną wyników densytometrii wykonano korzystając z testu istotności dla wartości średniej populacji (T-Studenta).

3.7.2 Analiza danych rejestrowanych techniką patch-clamp

Rejestracje zmian przepływającego prądu jonowego przez kanał analizowane były przy użyciu programu Clampfit 10 (Molecular Devices Corporation, USA). Poszczególne zapisy aktywności kanałów (ich otwarć) przedstawione w wynikach odpowiadają ich najczęstszemu przewodnictwu i reakjom kanału na zadane warunki. Przewodnictwo wyznaczono z zależności prądowo-napięciowej. Prawdopodobieństwo otwarć ($P(\text{otwarć})$) i amplitudę prądową określano przy użyciu jednej z funkcji programu Clampfit: Single-Channel Search. Wyliczenia robione były sumując fragmenty rejestrów ciągłego odczytu/nagrania przepływającego prądu trwającego po 60 s dla każdego jednorazowego pomiaru i dla $n > 1000$ zdarzeń (Skalska i wsp., 2008). Istotność statystyczną wyliczano przy zastosowaniu testu T-Studenta.

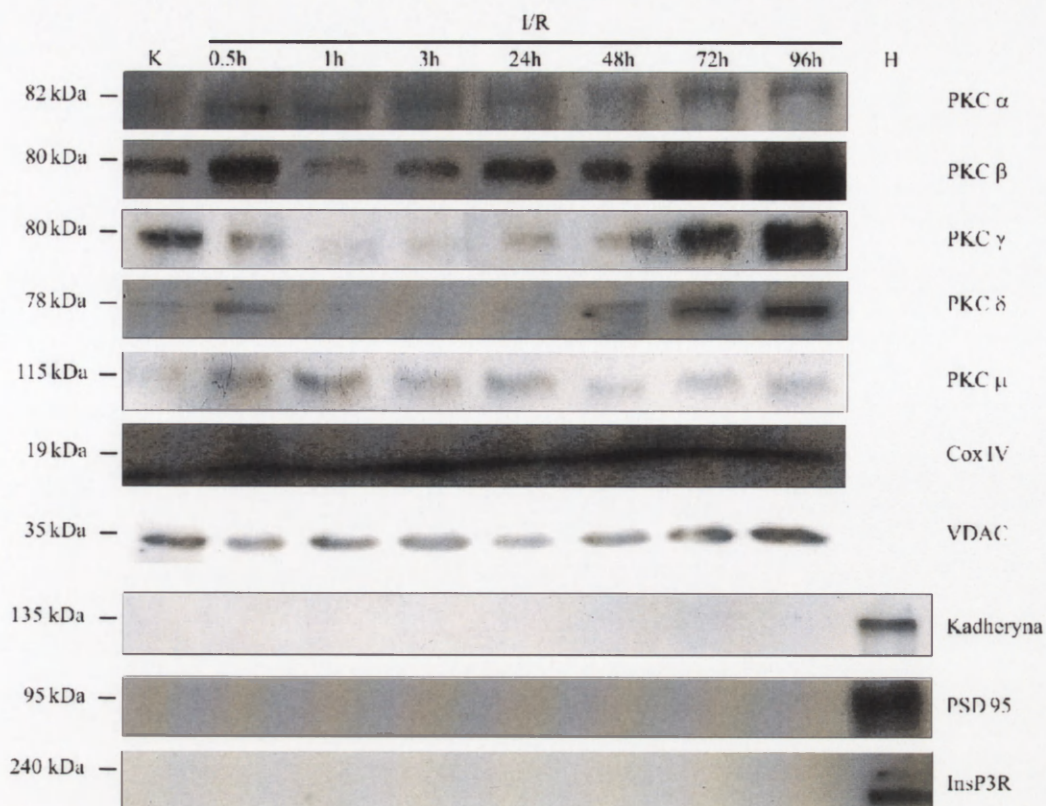
3.7.3 Analiza wyników spektrometrii mas

Do identyfikacji białek na podstawie widm otrzymanych w spektrometrze mas (Laboratorium Spektrometrii Mas, IBB PAN) wykorzystany został program Mascot (<http://www.matrixscience.com>). Jego działanie opiera się na porównaniu empirycznego widma fragmentacyjnego danego peptydu z fragmentacyjnymi widmami teoretycznymi, wygenerowanymi na podstawie sekwencji peptydowych dostępnych w bazach danych pierwszorzędowej struktury białek. Jakość tego porównania jest głównym czynnikiem determinującym wartość „score“, nadawaną peptydom. Score definiowany jest jako ujemny logarytm dziesiętny z prawdopodobieństwa, że dane porównanie jest zdarzeniem przypadkowym. Reasumując, im wyższa wartość score, tym wyższe prawdopodobieństwo, że przypisanie danego peptydu do białka jest poprawne. Wartość krytyczna score, powyżej której można uznać przypisanie za istotne statystycznie, zależy od bazy danych, w oparciu, o którą dokonywane jest przeszukiwanie. Dla niewielkich baz, wartość progowa jest szacowana na poziomie około trzydziestu, jednak zwiększając ilość zdeponowanych w bazie sekwencji, rośnie prawdopodobieństwo przypisania przypadkowego, dlatego wartość krytyczna wzrasta. W bazie danych wykorzystywanej w Laboratorium Spektrometrii Mas w IBB wartość krytyczna wynosiła <51 .

4. WYNIKI

4.1 Występowanie kinazy białkowej C w mitochondriach hipokampów w przebiegu ischemii i reperfuzji mózgu myszokoczka mongolskiego

W wyniku 5 minutowego niedokrwienia mózgu myszokoczka mongolskiego i izolacji mitochondriów z całych hipokampów w różnym czasie po przywróceniu krążenia (przedział od 0,5 do 96 godzin po niedokrwieniu) wykazano metodą Western Blot (WB) przy zastosowaniu odpowiednich przeciwciał, przemieszczanie się do mitochondriów następujących izoform PKC: α , β , γ , δ i μ . Obrazy immunoreakcji dla izoformy β , γ i δ wyróżniały się dwufazowością translokacji, z sygnałami o znacznej intensywności świecenia w krótkim (0,5 godziny) i późnym (72-96 godzin) czasie reperfuzji. Immunoreakcje z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko specyficznym białkom mitochondrialnym: COXIV i VDAC potwierdziły równą ilość nałożonego białka dając obraz prążków o bardzo zbliżonej intensywności świecenia. Brak sygnału w wyizolowanych mitochondriach, a jednocześnie obecność prążków w homogenacie z całych komórek hipokampa świadczy o czystości frakcji mitochondrialnej i braku zanieczyszczeń charakterystycznymi białkami błony plazmatycznej (kadheryna), siateczki śródplazmatycznej (receptor InsP3R) oraz zagęszczeń postsynaptycznych (PSD95) (Kowalczyk i wsp., 2009) (Ryc. 5).

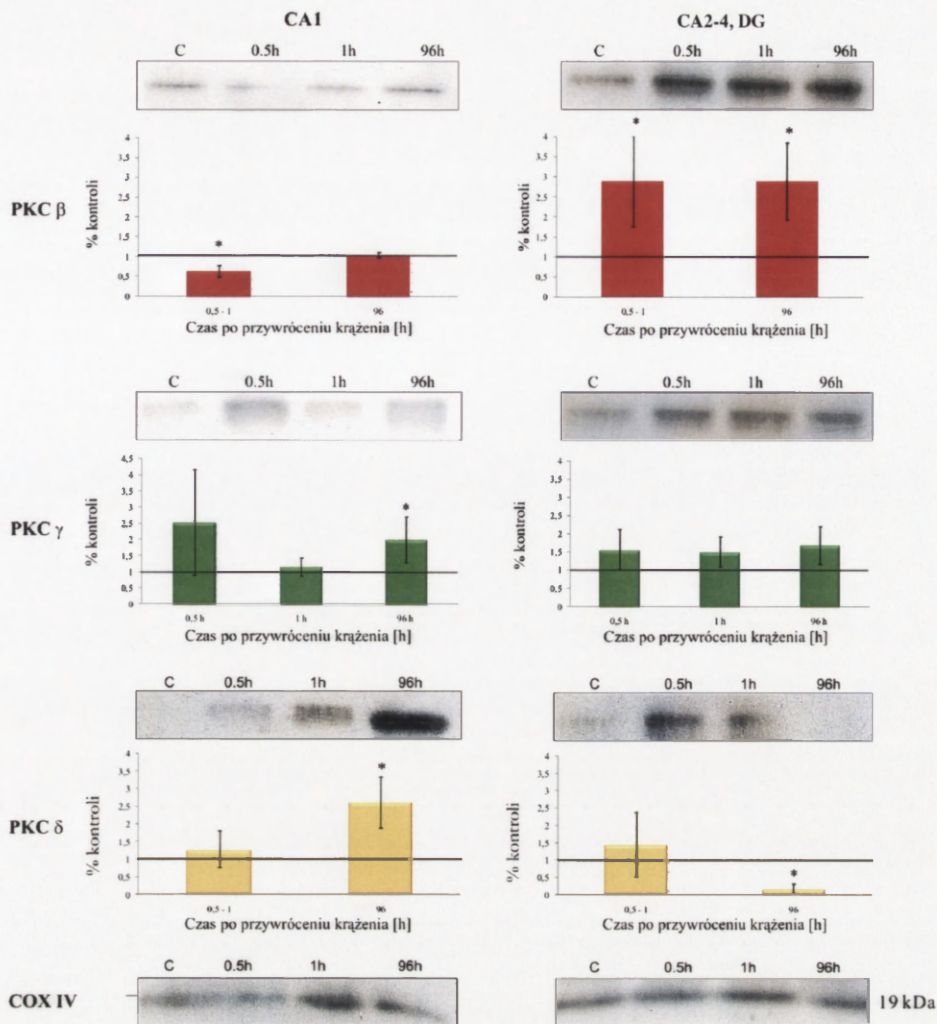


Ryc. 5 Występowanie wybranych izoform PKC w mitochondriach izolowanych z hipokampów myszokoczka w przebiegu reperfuzji po 5 minutowym niedokrwieniu mózgu. Przeciwciał anti-COXIV i anti-VDAC użyto jako markerów frakcji mitochondrialnej oraz nałożenia tej samej ilości białka w każdej ścieżce. Immunoreakcję z przeciwciałami anti-kadheryna, anti-PSD95 i anti-InsP3R zastosowano w celu sprawdzenia zanieczyszczenia frakcji mitochondrialnej białkami błony plazmatycznej, zagęszczeń synaptycznych oraz błonami siateczki śródplazmatycznej. Do każdej ścieżki nakładano 30 μ g białka. I/R – czas reperfuzji zwierząt po 5 minutowej ischemii (w godzinach: 0,5h, 1h, 3h, 24h, 48h, 72h i 96h), K – kontrola, H – homogenat hipokampa. Przedstawiono obrazy WB charakterystyczne dla 5 niezależnych doświadczeń (Kowalczyk i wsp., 2009).

4.2 Translokacja wybranych izoform PKC β , δ i γ do mitochondriów wyizolowanych z dwóch rejonów hipokampa myszokoczka po ischemii i krótkim oraz długim czasie reperfuzji

Do dalszych badań wpływu ischemii i reperfuzji na poziom immunoreaktywności PKC w mitochondriach izolowanych w dwóch różnie reagujących na krótkie niedokrwienie części hipokampa wybrano izoformy β , δ i γ .

Metodą Western Blot wykazano dwu i pół - krotny wzrost immunoreaktywności izoformy PKC β występujący wyłącznie w mitochondriach wyizolowanych z mniej wrażliwego na krótkotrwałe niedokrwienie rejonu hipokampa CA2-4, DG myszokoczka (Ryc.6).



Ryc.6 Zmiany poziomu immunoreaktywności izoform PKC β , γ i δ w mitochondriach otrzymanych z części hipokampa CA1 wrażliwej oraz części CA2-4, DG odpornej na niedokrwienie mózgu obserwowane po 5 minutowej ischemii w krótkim (0,5h i 1h) i późnym (96h) czasie po przywróceniu krążenia (h - godzina). Na każdą ścieżkę nakładano 30 μ g białka. Klisze z obrazami WB poddano analizie densytometrycznej i przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm SD (n=5), * p < 0,05 względem kontroli (pozioma linia przy wartości = 1). W wykresach dla PKC β i δ okres 0,5 i 1 godziny po niedokrwieniu przedstawiono łącznie (Kowalczyk i wsp., 2009).

Zaobserwowany przyrost miał miejsce zarówno w krótkim (0,5-1 godziny), jak i w późnym czasie (96 godzin) po przywróceniu krążenia. Natomiast w rejonie CA1 hipokampa, wrażliwym na uszkodzenie ischemiczne takiej wzmożonej translokacji PKC β do mitochondriów nie obserwowano. W przypadku izoformy PKC δ obserwowano istotny statystycznie (p <0,05, n=5) przyrost immunoreaktywności po 96 godzinach po niedokrwieniu w części CA1, natomiast obniżenie ilości w części odpornej na niedokrwienie. Immunoreaktywność specyficznej dla mózgu izoformy gamma nie różniła się ani pomiędzy próbkami kontrolnymi, badanymi czasami reperfuzji i obszarami hipokampa z wyjątkiem tendencji wzrostowej obserwowanej w długim okresie po niedokrwieniu w rejonie CA1 hipokampa.

Na podstawie przedstawionych danych można sugerować, że poniedokrwienny przyrost izoformy δ w mitochondriach w obszarze CA1 może być związany z uszkodzeniem komórek, natomiast przyrost immunoreaktywności izoformy β może wiązać się z wewnętrznym mechanizmem ochronnym w obszarach mniej wrażliwych na krótkotrwałe niedokrwienie.

4.3 Poszukiwanie mitochondrialnych białkowych partnerów PKC δ

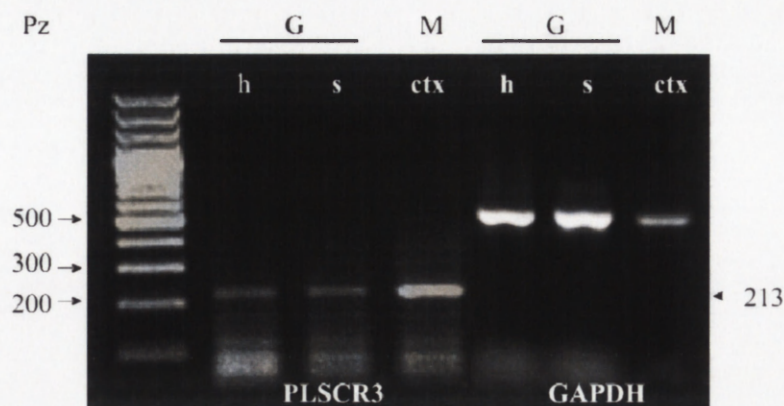
Następnym etapem badań była weryfikacja hipotezy o udziale PKC δ w poischemicznej eliminacji neuronów w polu CA1 hipokampa. Na podstawie literatury (Liu i wsp., 2003a) postanowiono sprawdzić czy PKC δ może oddziaływać z mitochondrialną izoformą skramblazy fosfolipidów (PLSCR3), co może być elementem przebudowy błon mitochondrialnych i etapem uwalniania cytochromu c z mitochondriów, które to zjawisko jest wpisane w proces opóźnionej, poniedokrwiennnej śmierci neuronów (Domanska-Janik i wsp., 2004). W piśmiennictwie nie znaleziono informacji na temat ekspresji PLSCR3 w mózgu, dlatego badania rozpoczęto od sprawdzenia czy enzym ten jest wyrażany w mózgu myszokoczka.

4.3.1 Skramblaza fosfolipidów 3 (PLSCR3) jest wyrażana w mózgu gryzoni na poziomie mRNA

W celu weryfikacji założenia, że PKC δ uczestniczy w mechanizmie poischemicznej eliminacji uszkodzonych komórek w sektorze CA1 podjęto poszukiwanie ekspresji i oddziaływań białka skramblazy fosfolipidów w hipokampach.

W wyniku izolacji RNA z kory mózgu myszy oraz hipokampa i śledziony myszokoczka, otrzymując cDNA, a następnie używając zdegenerowany starter (zaprojektowany na bazie mRNA sekwencji szczurzej, mysiej, wołowej, psiej oraz ludzkiej - kolejno NCBI Gen Bank BC098055, AK029154, NW_876313, BT029864, AK075188) oraz starter specyficzny dla mysiego rejonu 942 - 958 pz stosując metodę RT-PCR wykazano, że gen izoformy 3 skramblazy fosfolipidów jest wyrażany w mózgu myszy (kora) oraz myszokoczka (hipokamp) (Kowalczyk i wsp., 2009) (Ryc.7). Spodziewany produkt miał masę 218 pz. Ponieważ we wcześniejszych doniesieniach nie wykazano obecności produktu tego genu w mózgu, w niniejszej pracy, jako pozytywną kontrolę zastosowano mRNA izolowane ze śledziony myszokoczka, jednego z narządów, w którym gen *PLSCR3* jest wyrażany (Wiedmer i wsp., 2000; Sahu i wsp., 2007). Ekspresja GAPDH posłużyła za pozytywną kontrolę czystości frakcji RNA. Sekwencja wyciętych i

oczyszczonych produktów RT-PCR myszokoscza i myszy kolejno odpowiadała 96% oraz 99% homologii do mRNA PLSCR3 myszy (Gen Bank AK029154).



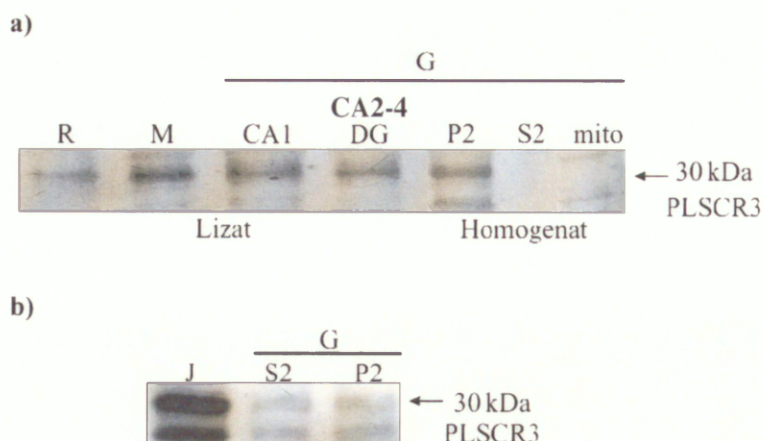
Ryc. 7 Izoforma 3 skramblazy fosfolipidów (PLSCR3) jest wyrażana w mózgu gryzoni na poziomie mRNA. Obraz elektroforetyczny produktów RT-PCR mRNA PLSCR3 dla różnych gatunków i tkanek (G – myszokosczek; M – mysz; h – hipokamp; s – śledziona, ctx – kora mózgu). Ekspresja GAPDH posłużyła jako kontrola czystości mRNA. Przedstawione przykłady analizy w żelu agarozowym są charakterystyczne dla 5 niezależnych doświadczeń (Kowalczyk i wsp., 2009).

4.3.2 PLSCR3 jest wyrażana w mózgu na poziomie białka

Równolegle do analiz przeprowadzanych na poziomie mRNA, w celu wykazania ekspresji PLSCR3 w mózgu gryzoni, wykonano badania na poziomie białka stosując metodę Western Blot.

Wykorzystano do tego dwa różne przeciwciała poliklonalne, jedno rozpoznające całą cząsteczkę rekombinowanego PLSCR3 myszy (Abnova) i drugie, rozpoznające fragment 95-111 białka ludzkiego (Abcam). Uzyskane na wysokości ok. 30 kDa prążki odpowiadały masie PLSCR3 oszacowanej na podstawie sekwencji białka. Wykazano obecność PLSCR3 w mózgu szczura, myszy, w ludzkich komórkach T Jurkat oraz w różnych rejonach hipokampa (CA1, CA2-4, DG), frakcji P2, S3 i czystych mitochondriach myszokoscza (Ryc.8). Do analizy użyto ekstraktów komórkowych (kora mózgowa homogenizowana była w buforze LB) oraz homogenatów (użyto buforu BH do izolacji mitochondriów) w ilości 15 µg dla każdej z próbek z wyjątkiem komórek T Jurkat, których nałożono 5 µg na ścieżkę. Ponieważ PLSCR3 jest białkiem związanym z błonami komórkowymi spodziewano się jego obecności we frakcjach P2 (wzbogaconej w mitochondria) oraz w czystych mitochondriach. We frakcji S2 nie spodziewano się obecności skramblazy jednak przy zastosowaniu jednego z przeciwciał sygnał był równie

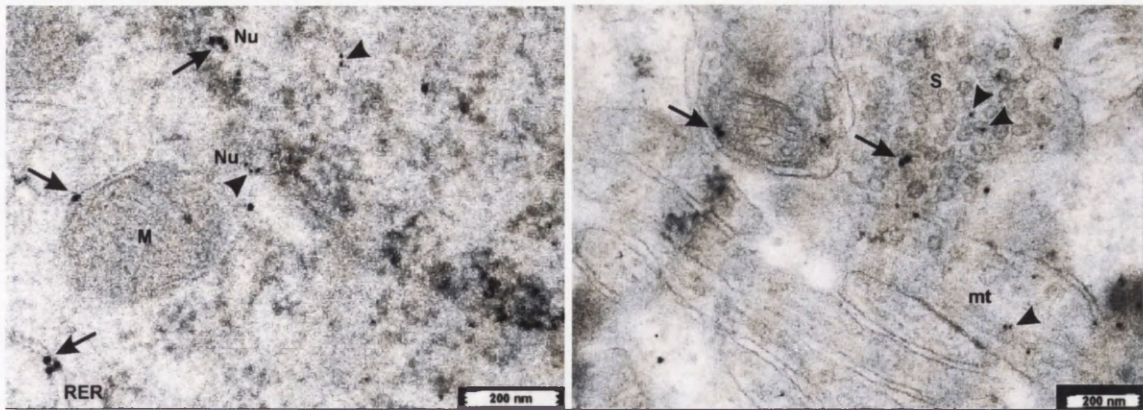
wyraźny co dla frakcji P2, co może być związane z zanieczyszczeniem frakcji cytosolowej błonami siateczki śródplazmatycznej, pęcherzyków synaptycznych lub mitochondriami.



Ryc.8 Izoforma 3 skramblazy fosfolipidów (PLSCR3) jest wyrażana w mózgu gryzoni na poziomie białka. Analizy Western blot ($n = 5$) z użyciem dwóch różnych poliklonalnych przeciwciał anti-PLSCR3 specyficznych dla (a) całej cząsteczki białka myszy (Abnova) oraz (b) dla fragmentu 95-111 aa ludzkiego białka PLSCR3 (Abcam). Immunoreakcje wskazują na obecność białka w mózgu różnych gatunków gryzoni (R – kora mózgu szczura; M – kora mózgu myszy; G – hipokamp myszokoczek z wyróżnieniem regionów CA1, CA2-4, DG oraz podziałem na frakcje komórkowe tj. S2 – cytosolową, P2 – wzbogaconą w mitochondria, mito – oczyszczone mitochondria) oraz w komórkach T Jurkat (J).

4.3.3 PLSCR3 występuje głównie w mitochondriach

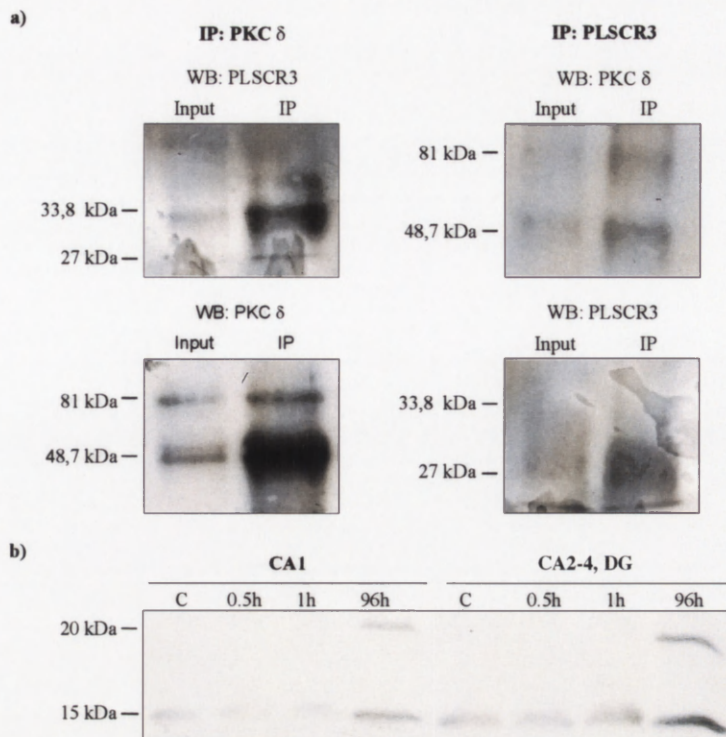
Kolejną zastosowaną metodą umożliwiającą sprawdzenie lokalizacji PLSCR3 w komórce była immunocytochemia w mikroskopie elektronowym przeprowadzona na skrawkach mózgu kontrolnego myszokoczek z użyciem przeciwciał anti-PLSCR3 znakowanych kulkami złota o średnicy 18 nm. Równocześnie, dla potrzeb dalszych badań, pokazano również lokalizację PKC δ stosując przeciwciało rozpoznające to białko wyznakowane kulkami złota o średnicy 12 nm. Wykazano, że PLSCR3 występuje głównie w błonie mitochondrialnej, ale także w jądrze komórkowym i nukleoplazmie, w zakończeniach post- i presynaptycznych, siateczce śródplazmatycznej oraz mikrotubulach. PKC δ zaobserwowano zarówno w błonach mitochondriów jak i macierzy mitochondrialnej, a także (podobnie jak PLSCR3) w jądrze komórkowym, nukleoplazmie, mikrotubulach i w pęcherzykach synaptycznych zakończeń presynaptycznych (Ryc.9).



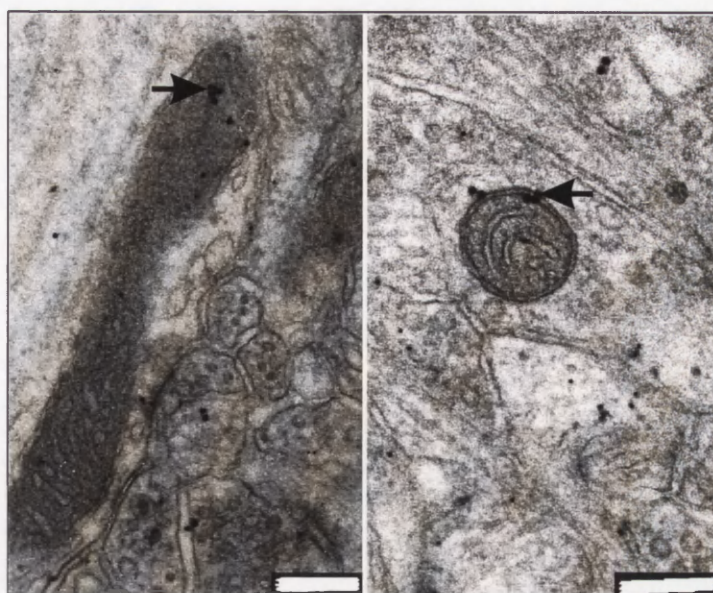
Ryc.9 Obraz immunocytochemii w mikroskopie elektronowym pokazujący występowanie izoformy 3 skramblazy fosfolipidów (PLSCR3) oraz PKC δ w mózgu myszkosczka. Czarne punkty odpowiadają 18 nm kulkom złota sprzężonym z przeciwciałem poliklonalnym rozpoznającym PLSCR3 (strzałki) i 12 nm z przeciwciałem monoklonalnym anti-PKC δ (główki strzałek). Występowanie PLSCR3 i PKC δ w kontrolnym hipokampie obserwowane jest w mitochondriach (M), otoczce jądrowej, porach otoczki jądrowej (Nu), nukleoplazmie, cytoplazmie, w siateczce śródplazmatycznej (RER) neuronu, pęcherzykach synaptycznych i mikrotubulach (mt) synaps (S). Obrazy z mikroskopu elektronowego są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń. Skala – 200 nm

4.3.4 PKC δ tworzy kompleks z PLSCR3 w mitochondriach wyizolowanych z mózgu myszkosczka mongolskiego po krótkotrwałej ischemii

Dalsze badania wykazały współwystępowanie izoformy PKC δ z PLSCR3 w mitochondriach. Badania metodą koimmunoprecypitacji czystych mitochondriów zarówno z przeciwciałem specyficznym dla PKC δ jak i PLSCR3 wykazały obecność badanych białek (odpowiednio PLSCR3 i PKC δ) w izolowanym kompleksie (Ryc.10 a). Obserwacja ta została potwierdzona badaniami w mikroskopie elektronowym. Podwójne znakowanie skrawków hipokampa myszkosczka po ischemii i 96 godzinach reperfuzji wskazują na współwystępowanie w mitochondriach PKC δ i PLSCR3. Obrazy takie (Ryc.11) występowały w rejonie CA1 hipokampa, a nie znaleziono ich w rejonie zakrętu zębatego w badanym materiale (n = 5). Dodatkowo wykazano przyrost immunoreaktywności proapoptotycznego białka tBid w mitochondriach w czasie reperfuzji po 5 minutowej ischemii, który jednak nie różnił się pomiędzy rejonami mózgu (Ryc.10 b).



Ryc. 10 a) PLSCR3 i PKC δ kolokalizują we wrażliwym na niedokrwienie rejonie CA1 hipokampa w 96 godz. po 5 minutowej ischemii mózgu. Koimmunoprecypitacja (IP) PLSCR3 i PKC δ w poischemicznych mitochondriach zobrażowana została metodą Western Blot (WB) przy użyciu poliklonalnego przeciwciała anti-PLSCR3 i anti-PKC δ rozpoznającego C-terminalną część całego (78 kDa) białka i domeny katalitycznej (50 kDa). b) Poischemiczne zmiany w immunoreaktywności tBid związanego z mitochondriami w rejonie wrażliwym (CA1) oraz w rejonie CA2-4, DG hipokampa odpornym na niedokrwienie mózgu mysoskoczków kontrolnych oraz w krótkim (0,5 i 1 godzina) i długim (96 godzin) czasie po przywróceniu krążenia. Do każdej ścieżki nakładano 30 μ g białka. Przeciwciała anti-Bid rozpoznawało całe białko Bid (20 kDa) oraz fragment proteolityczny tBid (15 kDa). Obrazy WB są reprezentatywne dla 5 niezależnych doświadczeń.



Ryc.11 Współwystępowanie PLSCR3 i PKC δ we wrażliwym na niedokrwienie rejonie CA1 hipokampa w 96 godz. po 5 minutowej ischemii mózgu. Immunocytochemia w mikroskopie elektronowym. Czarne punkty - 18 nm kulki złota sprzężone z przeciwciałem poliklonalnym rozpoznającym PLSCR3 i 12 nm z przeciwciałem monoklonalnym anty-PKC δ - pokazują współwystępowanie tych dwóch białek w błonie mitochondrialnej i na grzebieniach mitochondrialnych (strzałki). Skala - 200 nm. Obrazy z mikroskopu elektronowego są reprezentatywne dla 5 niezależnych doświadczeń.

Przedstawione wyniki wydają się potwierdzać założenie, że istotny, poischemiczny przyrost PKC δ w mitochondriach we wrażliwym na krótkotrwałe niedokrwienie rejonie hipokampa może być związany z uruchomieniem mitochondrialnej ścieżki apoptozy *in vivo*. PKC δ oddziałuje ze skramblazą fosfolipidów w mitochondriach. Skutkiem tego może być zmiana lokalizacji kardiolipiny w błonach i wypływ cytochromu c. Mechanizm taki został wcześniej opisany w doświadczeniach *in vitro*, a wpływ cytochromu c został też potwierdzony w badaniach *in vivo* (Domanska-Janik i wsp., 2004; Liu i wsp., 2004).

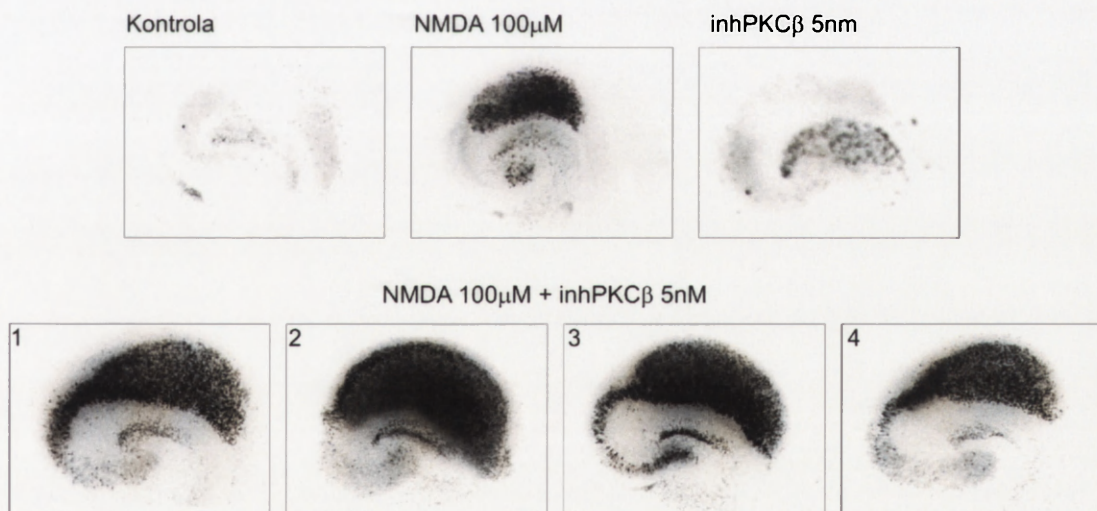
4.4 Poszukiwanie mitochondrialnych partnerów białkowych PKC β

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono wskazówek, które pozwoliłyby na bezpośrednie wytypowanie białek, z którymi może w mitochondriach oddziaływać PKC β , zatem poszukiwano mitochondrialnych partnerów PKC β stosując trzy równoległe podejścia badawcze. Po pierwsze, w hodowli organotypowej skrawków hipokampa szczura weryfikowano hipotezę, że aktywność PKC β ma działanie ochronne, po drugie szukano w mitochondriach kanałów jonowych, których aktywacja może być związana z

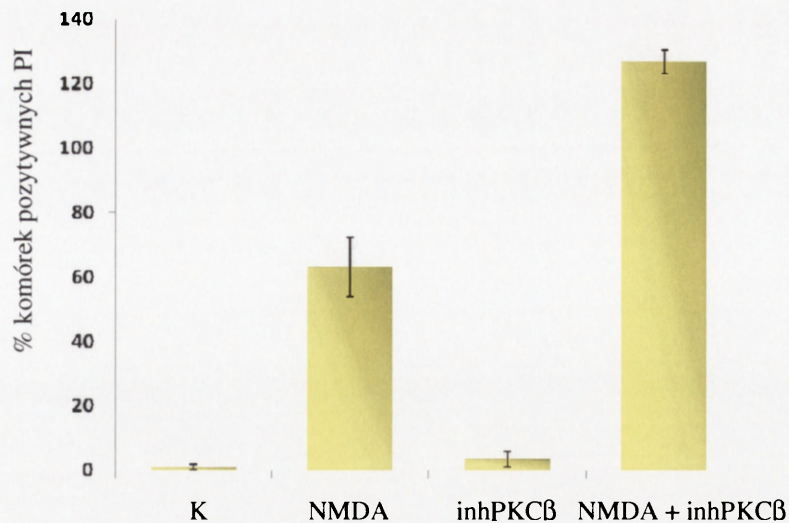
hartowaniem ischemicznym i neuroprotekcją (Garg i Hu, 2007) oraz stosując metodę „pull-down” szukano mitochondrialnych białek bezpośrednio oddziałujących z PKC β .

4.4.1 Hamowanie aktywności PKC β *in vitro*

Pierwszym etapem weryfikacji hipotezy o neuroprotekcynym działaniu PKC β było zastosowanie inhibitora PKC β w hodowli organotypowej hipokampa szczura. W warunkach kontrolnych oraz w uszkodzeniu ekscytotoksycznym skrawków hipokampa przez 100 μ M NMDA wykazano, że 5 nM 3-(1-(3-Imidazol-1-ylpropyl)-1H-indol-3-yl)-4-anilino-1H-pyrrole-2,5-dion – specyficzny inhibitor PKC β pogłębia uszkodzenie hipokampa (Ryc.12, 13). Pociąganiu samego inhibitora PKC β uszkodzeniu, które wyznakowano jodkiem propidyny (PI), ulegał głównie obszar zakrętu zębatego (DG), a w układzie inhibitora PKC β z NMDA obszar uszkodzenia był ponad dwukrotnie większy niż obserwowany tylko po podaniu 100 μ M NMDA i prócz rejonu CA1 obejmował także neurony CA2-4 i DG.



Ryc.12 Wpływ inhibitora PKC β na uszkodzenie hipokampa w hodowli organotypowej *in vitro*. Obrazy skrawków hipokampa wybarwione jodkiem propidyny po uszkodzeniu ekscytotoksycznym (NMDA) oraz po podaniu 3-(1-(3-Imidazol-1-ylpropyl)-1H-indol-3-yl)-4-anilino-1H-pyrrole-2,5-dionu – specyficznego inhibitora PKC β . Zdjęcia w mikroskopie fluorescencyjnym wykonano 24 godziny po inicjacji uszkodzenia przez 3 godzinną inkubację skrawków ze 100 μ M NMDA. Inhibitor PKC β (5 nM) podawany był jednocześnie z NMDA i pozostawał w medium hodowlanym do końca doświadczenia.



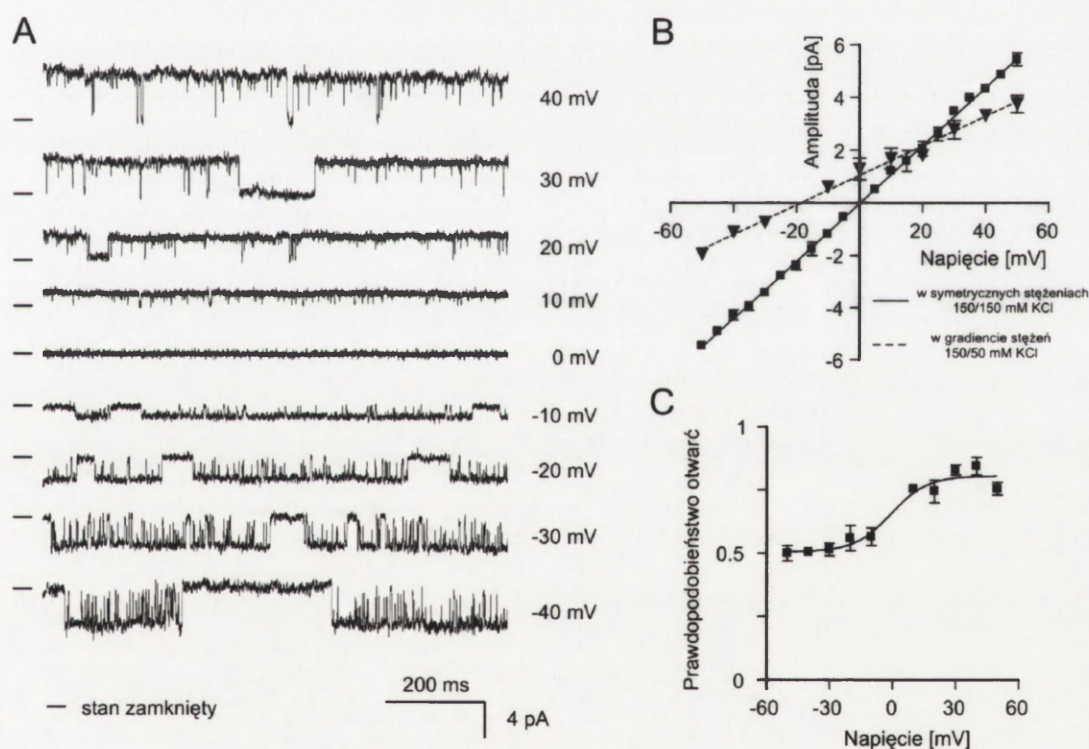
Ryc.13 Analiza densytometryczna wpływu inhibitora PKC β na uszkodzenie hipokampa w hodowli organotypowej *in vitro*. Słupki przedstawiają średni procent komórek uszkodzonych PI-pozytywnych będącymi średnimi arytmetycznymi \pm SD z 3-5 niezależnych doświadczeń. W każdym doświadczeniu analizowano 10-15 skrawków hipokampa dla poszczególnych warunków doświadczalnych. Testowany związek podawano łącznie z NMDA. K – kontrola, NMDA – N-metylo-D-asparaginian (100 μ M), inhPKC β – inhibitor PKC β : 3-(1-(3-Imidazol-1-ylpropyl)-1H-indol-3-yl)-4-anilino-1H-pyrrole-2,5-dion (5 nM), NMDA + inhPKC β – 100 μ M NMDA + 5 nM inhibitor PKC β).

4.4.2 Charakterystyka kanału potasowego regulowanego napięciem obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej hipokampa myszokoczka mongolskiego

W kolejnym etapie badań postanowiono zweryfikować hipotezę o ochronnej roli PKC β w mitochondriach. Na podstawie dotychczasowych wyników wskazujących, że izoforma PKC β wykazuje mitochondrialną lokalizację w obszarze hipokampa względnie mało wrażliwym na stres ischemiczno-reperfuzyjny (Ryc.6, strona 44) oraz, że jej aktywność zwiększa przeżywalność neuronów w uszkodzeniu ekscytotoksycznym (Ryc.13), założono, że być może uczestniczy ona w aktywacji mechanizmu ochronnego indukowanego krótkotrwałym niedokrwieniem. W tym celu zdecydowano sprawdzić czy w mitochondriach izolowanych z mózgu myszokoczka znajdują się kanały jonowe, których aktywność może być regulowana przez PKC β .

4.4.2.1 Właściwości biofizyczne mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego napięciem

Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego przez kanał w wewnętrznej błonie mitochondrialnej w czasie przy różnym zakresie potencjałów w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, 20 mM Hepes-KOH, 100 μ M CaCl₂, pH = 7,2 zostały przedstawione na Rycinie 14A. Otrzymane rejestracje świadczą o hamowaniu aktywności kanału przy potencjale mniejszym niż -25 mV, co wskazuje na regulację kanału przez napięcie. Rycina 14B przedstawia zależności prądowo-napięciowe zarejestrowanych otwarć pojedynczego kanału w symetrycznym układzie stężeń (linia ciągła, ■) oraz w układzie różnicy stężeń 50/150 KCl, 20 mM Hepes, 100 mM CaCl₂, pH = 7,2 (linia przerywana, ▼).

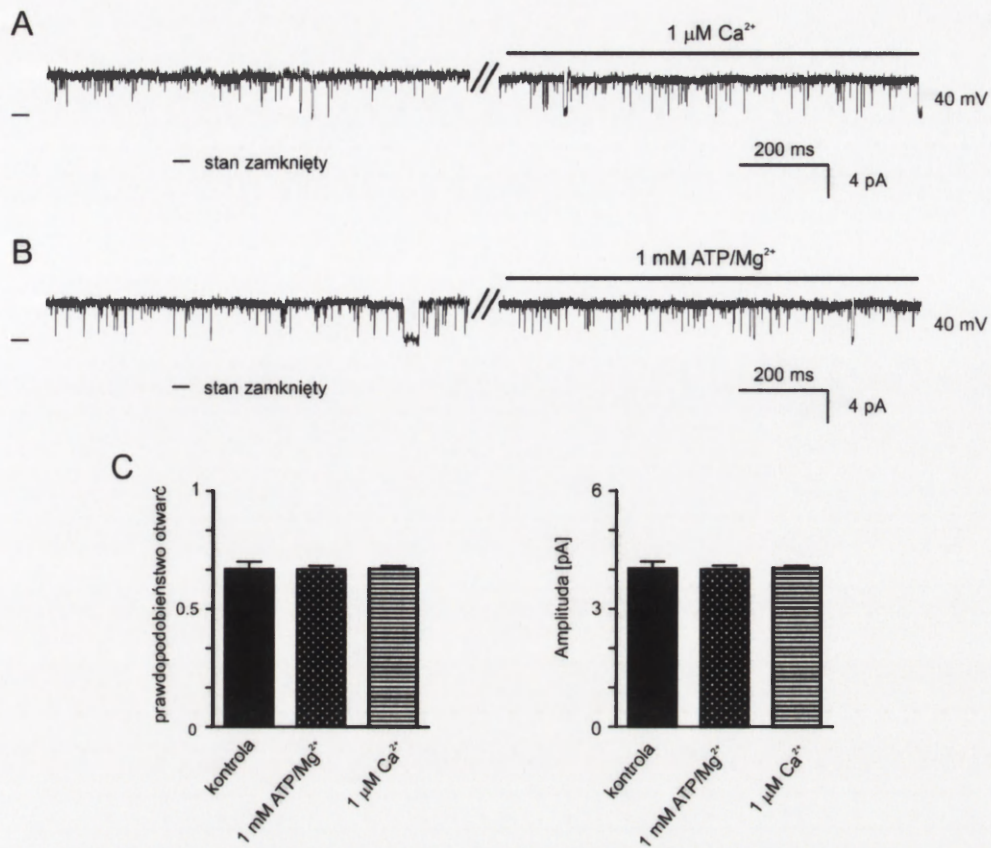


Ryc. 14 Właściwości biofizyczne kanału potasowego regulowanego napięciem (kanału mitoKv) obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej izolowanej z hipokampa myszokoczka mongolskiego. (A) Rejestracje zmian przepływającego prądu jonowego przez kanał w czasie przy różnym zakresie potencjałów w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl – oznacza stan zamknięty kanału. (B) Zależności prądowo-napięciowe zarejestrowanych otwarć pojedynczego kanału przy różnym zakresie potencjałów, w symetrycznym w układzie stężeń 150/150 KCl (linia ciągła, ■) oraz w układzie różnicy stężeń 50/150 KCl (linia przerywana, ▼). (C) Wykres przedstawiający prawdopodobieństwo otwarć kanału w symetrycznym układzie stężeń 150/150 mM KCl w zależności od napięcia. Wykresy B i C przedstawiają wyniki średnich arytmetycznych \pm SD dla trzech niezależnych eksperymentów.

Z analizy zależności prądowo-napięciowej w symetrycznym w układzie stężeń wynika, że przewodnictwo kanału wynosi 109 ± 6 pS (piko Siemens). Na podstawie charakterystyki napięciowo-prądowej w układzie różnicy stężeń wyznaczono potencjał odwrócenia: -19 mV, co świadczy o wysokiej specyficzności zidentyfikowanego kanału dla jonów potasowych. Dodatkowo na Rycinie 14C pokazano, że prawdopodobieństwo otwarć obserwowanego kanału w symetrycznym układzie stężeń jest zależne od napięcia. Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie, że w wewnętrznej błonie mitochondrialnej w komórkach hipokampa myszokoczka mongolskiego obecny jest kanał potasowy regulowany przez napięcie (kanał mitoKv).

4.4.2.2 Wpływ kompleksu ATP/Mg²⁺ oraz jonów wapnia na aktywność kanału potasowego regulowanego napięciem obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej mózgu myszokoczka mongolskiego

W celu charakterystyki kanału potasowego regulowanego napięciem obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej mózgu myszokoczka mongolskiego przeprowadzono eksperymenty mające na celu zbadanie wpływu kompleksu adenylotrójfosforanu z jonami magnezu (ATP/Mg²⁺) oraz jonów wapnia na aktywność tego kanału. Gdyby kanał regulowany był przez ATP/Mg²⁺ bądź jony wapnia wówczas zidentyfikowanym kanałem mógłby być odpowiednio mitochondrialny kanał potasowy regulowany ATP (mitoK_{ATP}) lub mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie (mitoBK_{Ca}). W przeprowadzonych doświadczeniach w obydwu przypadkach nie obserwowano zmiany aktywności kanału potasowego pod wpływem działania jonów Ca²⁺ bądź kompleksu ATP/Mg²⁺. Badania te wykluczyły zatem oba wymienione kanały (Ryc.15).

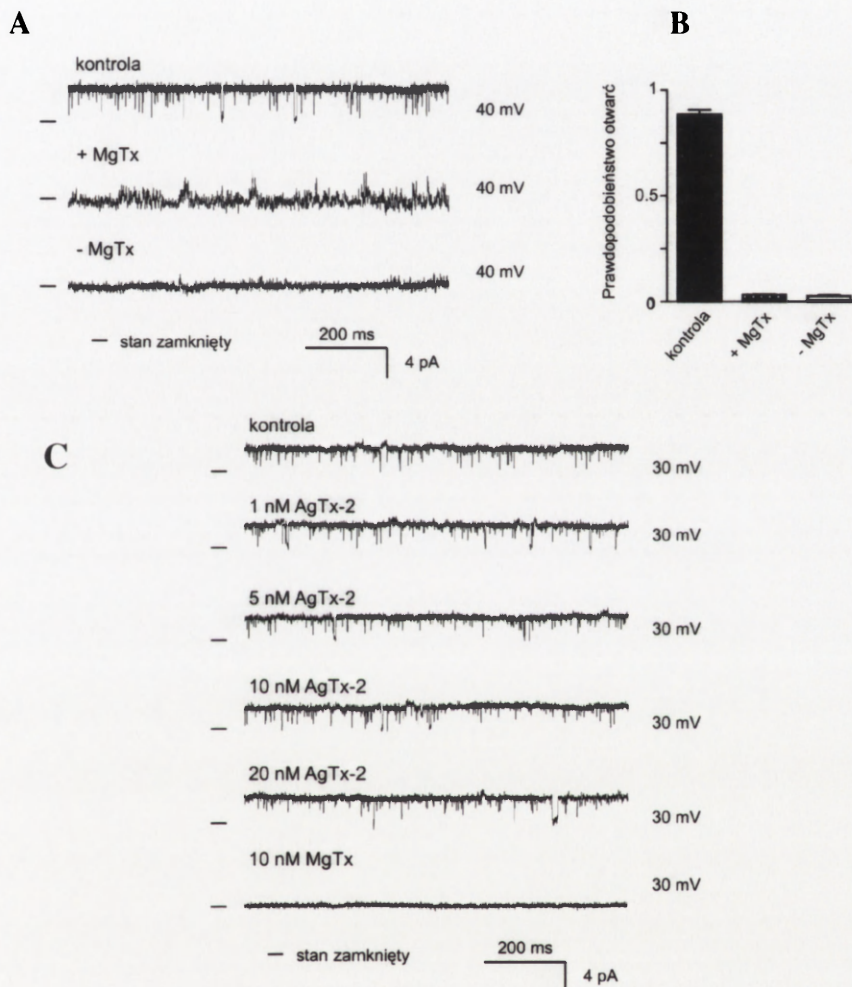


Ryc.15 Wpływ kompleksu ATP/Mg²⁺ i Ca²⁺ na aktywność mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego napięciem w mózgu myszokoczka mongolskiego. (A) Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego przez kanał mitoKv w czasie przy potencjale 40 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl w warunkach kontrolnych, w obecności 100 μM Ca²⁺ z dodatkiem 1 mM ATP. (B) Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego przez kanał mitoKv w czasie przy potencjale 40 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl w warunkach kontrolnych, w obecności 1 mM Mg²⁺ i 1 mM ATP. (C) Wykres przedstawiający prawdopodobieństwo otwarć kanału mitoKv oraz amplitudę prądową [pA] w warunkach kontrolnych w układzie stężeń symetrycznych 150/150 mM KCl. Przedstawione wyniki są średnimi arytmetycznymi ± SD dla trzech niezależnych eksperymentów.

4.4.2.3 Wpływ margatoksyny i agitoksyny-2 na aktywność kanału potasowego regulowanego napięciem obecnego w mitochondriach mózgu myszokoczka mongolskiego

Znane są substancje regulujące aktywność kanałów potasowych zależnych od napięcia, a tym samym umożliwiające ich dokładniejszą identyfikację i charakterystykę farmakologiczną. Istnieje specyficzny inhibitor kanału potasowego zależnego od napięcia Kv1.3 – margatoksyna (MgTx), która nieodwracalnie hamuje aktywność tego kanału

(Szabo i wsp., 2005). Rycina 16A ilustruje rejestrację zmian przepływu prądu jonowego przez kanał mitoKv w czasie przy potencjale 40 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl w warunkach kontrolnych oraz po podaniu 10 nM MgTx. Margatoksyna hamowała aktywność kanału i efekt ten okazywał się nieodwracalny. Prawdopodobieństwo otwarć kanału w porównaniu z kontrolą spada z 0,75 do 0,05 po podaniu 10 nM MgTx (Ryc.16B).

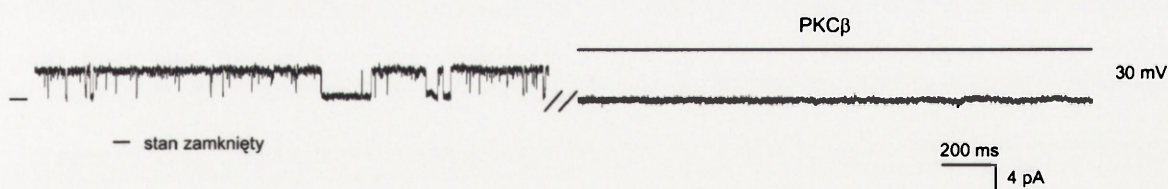


Ryc.16 Wpływ margatoksyny (MgTx) i agitoksyny-2 (AgTx) na aktywność kanału mitochondrialnego (mitoKv) w mózgu myszokoczka mongolskiego. (A) Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego przez kanał mitoKv w czasie przy potencjale 40 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, 20 mM Hepes-KOH, 100 μ M CaCl₂, pH = 7,2 w warunkach kontrolnych, po dodaniu 10 nM MgTx (+ MgTx) oraz po perfuzji buforem pozbawionym MgTx (- MgTx). (B) Wykres przedstawia prawdopodobieństwo otwarć kanału mitoKv, które wyliczone zostało na podstawie trzech niezależnych eksperymentów i przedstawione jako średnia arytmetyczna \pm SD (n = 3). (C) Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego przez kanał mitoKv w czasie przy potencjale 30 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM, 20 mM Hepes-KOH, 100 μ M CaCl₂, pH = 7,2 w warunkach kontrolnych i po podaniu różnych stężeń AgTx-2 (1, 5, 10, 20 nM). Podanie 10 nM MgTx posłużyło identyfikacji kanału mitoKv. – oznacza stan zamknięty kanału.

Drugim potencjalnym inhibitorem kanałów potasowych zależnych od napięcia z grupy Kv1.x jest agitoksyna-2 (AgTx-2). Podawanie różnych stężeń AgTx-2 przy potencjale 40 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl nie miało żadnego wpływu na aktywność kanału Kv. Za kontrolę pozytywną kanału Kv1.3 posłużyło podanie 10 nM MgTx, która hamowała aktywność kanału (Ryc.16C).

4.4.2.4 PKC β – inhibitor mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego napięciem

W warunkach kontrolnych kanał mitoKv jest aktywny oraz specyficzny dla kationów. W warunkach fizjologicznych kanał ten musi podlegać regulacji, aby np. zapobiegać napływowi jonów K^+ do mitochondriów. Ponieważ wcześniejsze wyniki wskazują na poischemiczny wzrost immunoreaktywności izoformy β kinazy białkowej C (PKC β) w mitochondriach (Ryc. 5, 6), podjęto próbę określenia wpływu tej kinazy na aktywność mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego napięciem. W tym celu przeprowadzono rejestrację zmian przepływu prądu jonowego przez kanał mitoKv w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl w warunkach kontrolnych oraz po podaniu 10 nM PKC β . Otrzymane wyniki świadczą o hamowaniu aktywności kanału przez PKC β , jednak trudno jednoznacznie określić sposób oddziaływania ze sobą tych białek.



Ryc.17 Wpływ PKC β na aktywność mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego napięciem (mitoKv) w mózgu myszokoczka mongolskiego. Rysunek przedstawia rejestrację zmian przepływu prądu jonowego przez kanał mitoKv w czasie przy potencjale 30 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM, 20 mM Hepes-KOH, 100 μ M CaCl₂, pH = 7,2 w warunkach kontrolnych i po podaniu 10 nM PKC β I (n = 5). – oznacza stan zamknięty kanału.

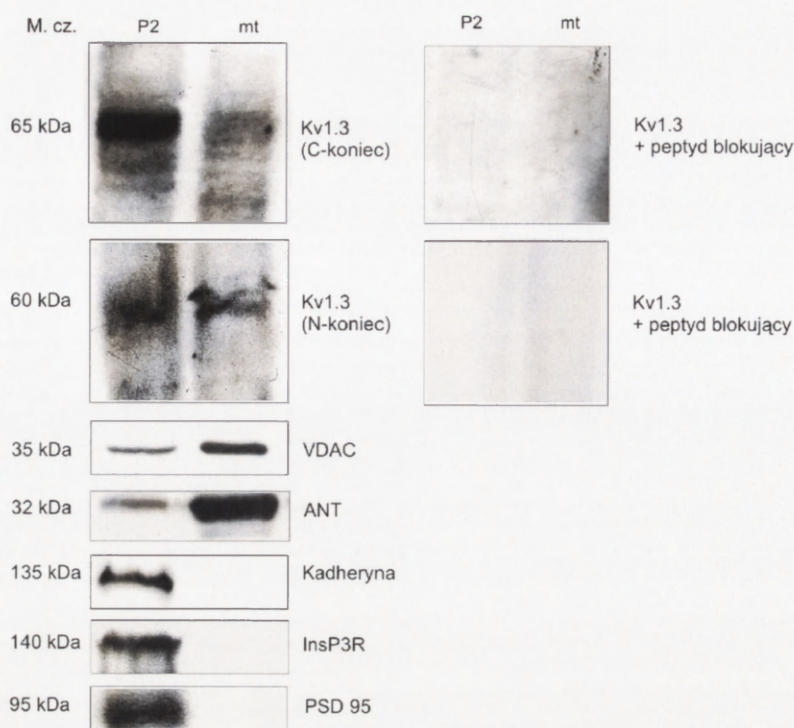
4.4.2.5 Badanie obecności mitochondrialnego kanału potasowego zależnego od napięcia Kv1.3 w mitochondriach mózgu myszokoczka

Zgodnie z dostępną nam wiedzą przedstawione badania elektrofizjologiczne po raz pierwszy wskazują na obecność w mitochondriach izolowanych z mózgu gryzonia

podjednostki Kv1.3 kanału potasowego zależnego od napięcia. Nieodwracalne zamknięcie tego kanału w obecności PKC β jest trudne do interpretacji, bowiem spodziewano się wzrostu częstości otwarć kanału, gdyby rzeczywiście PKC β miała brać udział w ochronie neuronów w stresie ischemiczno – reperfuzyjnym, podobnie jak było to sugerowane w przypadku PKC ϵ i kanałów mitoK_{ATP} w hartowaniu ischemicznym serca (Budasz i Mochly-Rosen, 2007). Niezależnie od problemów interpretacyjnych postanowiono zweryfikować wynik badań elektrofizjologicznych wykorzystując dostępne przeciwciała rozpoznające Kv1.3.

4.4.2.6 Podjednostka kanału potasowego zależnego od napięcia Kv1.3 jest wyrażana w mitochondriach myszokoczka – analiza Western Blot

Obecność białka kanałowego Kv1.3 została potwierdzona metodą Western Blot. W tym celu do analizy wykorzystano czystą frakcję mitochondrialną otrzymaną z kontrolnego hipokampa myszokoczka mongolskiego. Do doświadczenia użyto dwóch rodzajów przeciwciał i w obu przypadkach zaobserwowano ekspresję białka. Większy poziom immunoreaktywności (przy użyciu przeciwciała rozpoznającego N-koniec białka) w czystej frakcji mitochondrialnej (mt) w porównaniu z frakcją wzbogaconą w mitochondria (P2) wydaje się być uzasadniony faktem, że stężenie mitochondriów we frakcji mt jest większe niż w P2 przy jednakowej ilości całkowitego białka nakładanego na żel. Różnica ilościowa pomiędzy przeciwciałami może wynikać z różnych miejsc rozpoznawanych przez przeciwciała. We frakcji P2 białko Kv1.3 może występować w błonach plazmatycznych co było opisane wcześniej w hipokampie szczura (Veh i wsp., 1995). Dodatkowo wykonano hybrydyzację Western Blot po wcześniejszym zablokowaniu miejsc wiążących antygen w przeciwciałach w celu kolejnego potwierdzenia wiarygodności obserwowanego zjawiska (Ryc.18).

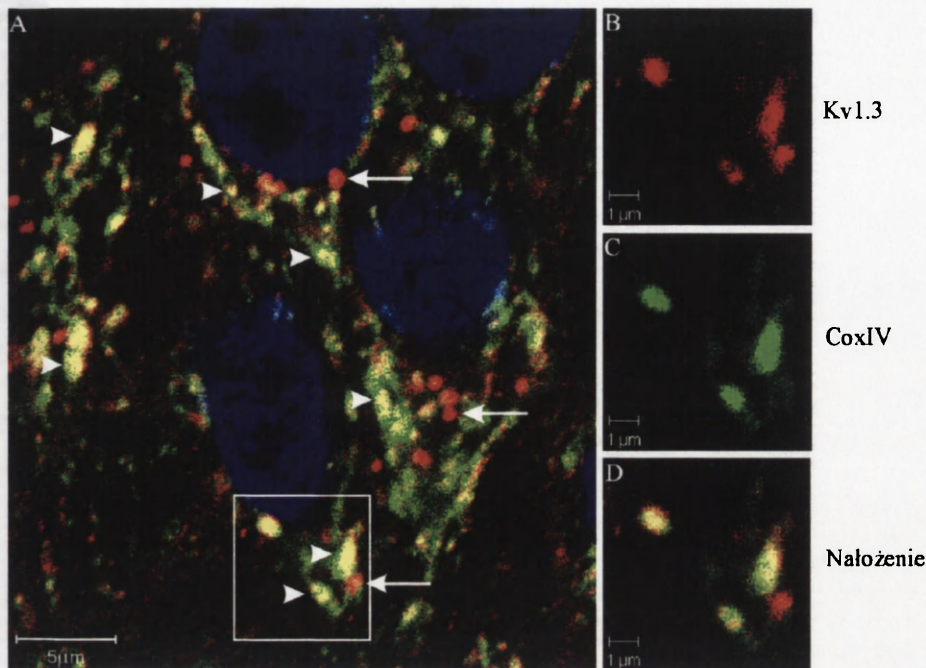


Ryc.18 Białko kanałowe Kv1.3 jest wyrażane w mózgu myszokoczka mongolskiego. Rycina przedstawia analizy Western Blot z użyciem dwóch różnych poliklonalnych przeciwciał anti-Kv1.3, rozpoznających fragment w okolicach C-końca cząsteczki ludzkiego białka (Santa Cruz) oraz fragment 211-224 zlokalizowany na N-końcu ludzkiego białka (Alomone). Immunoreakcje wskazują na obecność białka w mitochondriach wyizolowanych z hipokampa myszokoczka. Aby mieć pewność, że przypisano prążki właściwym białkom przeprowadzono analizy Western Blot z zastosowaniem peptydów blokujących specyficzne miejsca wiązania przeciwciał z antygenem. Przeciwciał anti-VDAC i anti-ANT użyto jako markerów frakcji wzbogaconej w mitochondria (P2) oraz czystej frakcji mitochondrialnej (mt). Immunoreakcję z przeciwciałami anti-kadheryna, anti-InsP3R i anti-PSD95 zastosowano w celu sprawdzenia zanieczyszczenia frakcji mitochondrialnej białkami błony plazmatycznej, zagęszczeń synaptycznych oraz błonami siateczki śródplazmatycznej. Na każdą ścieżkę nanoszono 30 μ g materiału. Immunoreakcje zostały przeprowadzone dla 3 niezależnych doświadczeń.

4.4.2.7 Kolokalizacja białka Kv1.3 z oksydazą cytochromową - markerem mitochondrialnym

W celu kolejnej weryfikacji czy białko Kv1.3 występuje w komórkach hipokampa myszokoczka mongolskiego zastosowano metodę immunohistochemicznego barwienia skrawków i jego wizualizacji w mikroskopie konfokalnym. Wykonano podwójne barwienie skrawków hipokampa sprawdzając współwystępowanie Kv1.3 z charakterystycznym białkiem błony mitochondrialnej – oksydazą cytochromową (COXIV). Wyniki barwień pokazały, że badane białko Kv1.3 występuje nie tylko na błonie

mitochondrialnej w sąsiedztwie białka COXIV, ale również lokalizuje się na plazmalemmie oraz na błonach innych organelli (Ryc. 19).

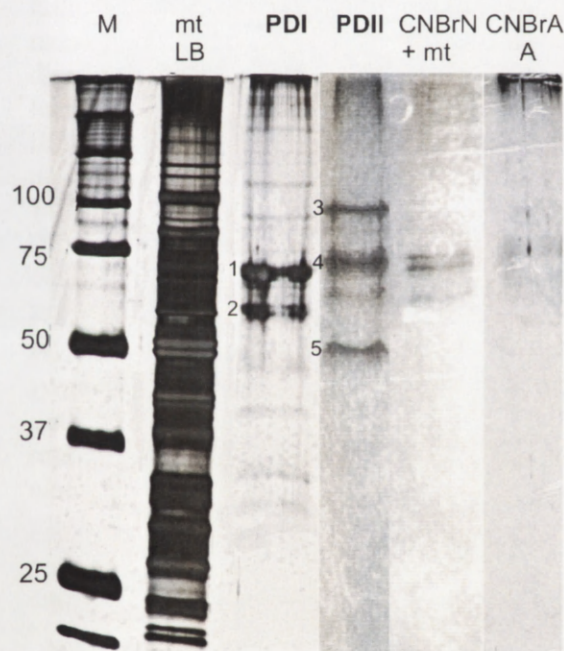


Ryc.19. Współwystępowanie białka kanałowego Kv1.3 z charakterystycznym dla mitochondriów białkiem oksydazą cytochromową COXIV w hipokampie kontrolnego myszokoczka mongolskiego. (A) Zdjęcie z mikroskopu konfokalnego obszaru CA3 przedstawia wybarwione przeciwciałem na czerwono białko Kv1.3 (strzałki) oraz na zielono oksydazę cytochromową COXIV. Kv1.3 lokalizuje się na plazmalemmie oraz na innych błonach organelli nie posiadających COXIV. Główki strzałek pokazują kolokalizację Kv1.3 i COXIV (kolor żółty, A, D) na błonach mitochondriów. Jądra komórkowe zostały wyznakowane niebieskim barwnikiem Hoechst 33258. Podobne współwystępowanie zaobserwowano w komórkach kory myszokoczka (dane niezamieszczone w pracy). (B, C, D) Powiększenie fragmentu zaznaczonego białym kwadratem na zdjęciu A pokazujące wyraźne współwystępowanie Kv1.3 i CoxIV na błonach mitochondriów.

4.5 Poszukiwanie białek mitochondrialnych oddziałujących z PKC β I

W kolejnym etapie badań podjęto próbę znalezienia białek mitochondrialnych, które mogą oddziaływać z PKC β I wykorzystując metodę chromatografii powinowactwa typu „pull-down” z rekombinowanym białkiem PKC β I (Sigma) sprzęgniętym z CNBr-Sefarozą. Na tak przygotowaną kolumnę nakładano białka ekstrahowane z czystej frakcji mitochondriów otrzymanych z kontrolnych hipokampów myszokoczka mongolskiego. Białka połączone z PKC β I wymywano z kolumny buforem do nakładania elektroforezy, rozdzielano w 10 % żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE i srebrzono. Jak przedstawiono

na Rycinie 20 w liniach PDI i PDII tylko nieliczne białka mitochondrialne zostały połączone ze złożem (CNBr sefaroza z PKC β I) w zadanych warunkach w porównaniu do licznych białek uwidocznionych w linii „mt LB”, której obraz przedstawia białkowy ekstrakt mitochondriów. Prażki białkowe oznaczone 1-5 zostały wycięte z żelu i poddane analizie metodą spektrometrii mas w Pracowni Sekwencjonowania Białek IBB PAN. Kolejne, niezależne analizy Mass Spec wykonane były na próbach białek mitochondrialnych oddziałujących z PKC β I nie poddanych rozdzielaniu elektroforetycznemu po chromatografii „pull-down”, lecz wytrąconych z buforu jak opisano w Materiach i Metodach w podrozdziale 3.6.2.5 (strona 37). Weryfikacji otrzymanych wyników i wykluczenia białek będących zanieczyszczeniami dokonano analizując białka mitochondrialne, które połączyły się z nieaktywną CNBr-Sefarozą czy białka będące w aktywowanym złożu (Ryc. 22, linie CNBrN+mt i CNBrAA).



Ryc. 20 Obraz wybarwionego srebrem żelu poliakrylamidowego (SDS-PAGE) z rozdzielonymi białkami mitochondrialnymi mózgu myszokoczka. Na żel nałożono 2 μ g ekstraktu mitochondriów w buforze ekstrakcyjnym (mt LB), frakcje „pull-down” białek zasocjowanych z rekombinowaną PKC β I sprzężoną z CNBr sefarozą (PDI i PDII) pochodzące z dwóch niezależnych doświadczeń, frakcję z doświadczenia kontrolnego z nieaktywnym złożem, na które był nałożony ekstrakt mitochondriów (CNBrN+mt) i aktywowane złożo niesprężone z PKC β I (CNBrA). M – marker mas cząsteczkowych. 1-5 – prążki wycięte z żelu i analizowane metodą spektrometrii mas.

W wyniku czterech niezależnych analiz wytypowano szereg białek mitochondrialnych, które potencjalnie mogą oddziaływać z PKC β I. Białka przedstawione

w Tabeli 10 powtarzały się w kolejnych analizach oraz charakteryzowały się prawdopodobieństwem sekwencji >51.

Tabela 10. Główne mitochondrialne białka występujące w kompleksie z PKC β I w mózgu myszokoczcza zidentyfikowane metodą spektrometrii mas

Białka mitochondrialne wykryte w kompleksie z PKC β I	Charakterystyka białka	Prawdopodobieństwo sekwencji Score > 51 ($p < 0,05$)
Kinaza kreatynowa (Mt-CK)	Enzym oddziałujący z VDAC oraz ANT w bliskim sąsiedztwie kardiolipiny, odgrywa rolę w komórkowej homeostazie ATP, może pełnić funkcję regulatora przepuszczalności MPTP - kanału mitochondrialnego.	520
Dehydrogenaza jabłczanowa i izocytrynianowa	Enzymy cyklu Krebsa w macierzy mitochondrialnej przenoszące równoważniki redukcyjne na nikotynoamidoadeninowy dinukleotyd NAD^+ , tworząc jego zredukowaną formę NADH.	312
Translokaza nukleotydów adeninowych (ANT)	Białko transportujące ATP i ADP z i do macierzy mitochondrialnej. Może współtworzyć transbłonowy megakanał (MPTP), którego otwarcie jest prawdopodobnie elementem mechanizmu eliminacji neuronów podczas ischemicznego uszkodzenia mózgu.	259
Podjednostki α i β F_1 mATPazy	Podjednostki kompleksu F_1 mitochondrialnej syntazy ATP znajdujące się w macierzy mitochondrialnej – enzymu katalizującego reakcję wytwarzania ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego P_i .	β – 136 α – 114
Dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanu (G3P-DH)	Enzym zlokalizowany w zewnętrznej powierzchni wewnętrznej błony mitochondrialnej tworzący 3-fosfoglicerynian; bierze również udział w tworzeniu wolnych rodników.	86
Oksydoreduktaza NADH –ubichinon (kompleks I)	Białko kompleksu I łańcucha oddechowego zlokalizowanego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, inaczej dehydrogenaza NADH – kompleks składający się z 46 podjednostek, katalizujący reakcję przeniesienia dwóch elektronów z NADH na ubichinon – niskocząsteczkowy przenośnik równoważników redukcyjnych.	71
Tioredoksyna (Trx)	Białko współtworzące kompleks z reduktazą tioredoksyny (TR) oraz NADPH. Bierze udział w redukcji mostków dwusiarczkowych kontrolując stan redoks w komórce dzięki swoim grupom sulfhydrylowym; uczestniczy m.in. w usuwaniu reaktywnych form tlenu.	71

Analiza sekwencji białek wykrytych w kompleksach z PKC β I wskazuje na obecność aminokwasów, które mogą być potencjalnie fosforylowane przez PKC lub zawierają specyficzne domeny (Tab. 11).

Tabela 11. Specyficzne domeny i aminokwasy białek oddziałujących z PKC β I w mózgu myszokoczka mongolskiego

Białka mitochondrialne wykryte w kompleksie z PKC βI	Liczba AA	Domeny białkowe/aminokwasy
Kinaza kreatynowa (Mt-CK)	25	Miejsce wiązania kardiolipiny
Dehydrogenaza jabłczanowa i izocytrynianowa	-	-
Translokaza nukleotydów adeninowych (ANT)	1 1	seryna, treonina,
Podjednostki α i β F₁ mATPazy	α - 1 β -	seryna -
Dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanu (G3P-DH)	2 2	seryna, treonina
Oksydoreduktaza NADH –ubichinon (kompleks I)	-	-
Tioredoksyna (Trx)	1	treonina

5. DYSKUSJA

Rodzina kinaz białkowych typu C została odkryta w końcu lat 70-tych XX wieku i przykuła uwagę wielu badaczy rozległością obszarów działania we wszystkich typach komórek i we wszystkich procesach w normie i patologii (Nishizuka, 1984; Nishizuka, 1986). W zjawisku opóźnionej poniedokrwiennej śmierci neuronów zwrócono uwagę na szybką aktywację PKC i następujące po niej zjawisko „down-regulacji” polegające na obniżeniu zarówno poziomu białka jak i aktywności enzymatycznej (Cardell i wsp., 1990; Domanska-Janik i Zalewska, 1992; Domanska-Janik i Zabłocka, 1993; Durkin i wsp., 1996). Aktywacja większości izoform PKC związana jest z przeniesieniem cząsteczek enzymu do błon komórkowych, gdzie znajdują się aktywatory (m.in. DAG, kwaśne lipidy) oraz z przyłączeniem jonów wapnia. Zatem po serii doniesień o poischemicznym przemieszczaniu się PKC z frakcji białek rozpuszczalnych do frakcji białek błonowych otrzymywanych z mózgu zwierząt doświadczalnych, pojawiły się doniesienia o lokalizacji poszczególnych izoform PKC w wyspecjalizowanych obszarach błon komórkowych np. w zagęszczeniach postsynaptycznych (PSD) (Hu i wsp., 1998; Zabłocka i wsp., 2001; Hu i wsp., 2001). PKC obecnej w PSD przypisuje się m. in. rolę jednego z regulatorów aktywności receptora NMDA (Jimenez i Tapia, 2004) oraz wpływ na aktywność szlaku MAPK poprzez oddziaływanie z kinazą Raf-1 (Ueda i wsp., 1996).

Udział mitochondriów w poniedokrwiennej śmierci neuronów badany był od wielu lat (Eklof i Siesjo, 1972; Fiskum, 1983; Domanska-Janik i wsp., 1985; Fiskum, 1985; Rosenthal i wsp., 1987; Starkov i wsp., 2004). Początkowo zwrócono uwagę na bioenergetykę mitochondriów i zahamowanie aktywności łańcucha oddechowego w czasie niedokrwienia. Ponadto, mitochondria są źródłem reaktywnych form tlenu, których udział w uszkodzeniu poischemicznym jest istotny. W okresie po przywróceniu krążenia obserwuje się wtórne uszkodzenie mitochondriów, które wiąże się z buforowaniem wolnych jonów wapnia (Siesjo i wsp., 1999). Z czasem, gdy mitochondria okazały się źródłem wielu białek proapoptotycznych związanych również z procesem opóźnionej poniedokrwiennej śmierci neuronów, rozpoczęła się nowa era badania udziału mitochondriów w tej patologii (Folbergrova i wsp., 1997; Uchino i wsp., 1998; Li i wsp., 2001; Uchino i wsp., 2002; Domanska-Janik i wsp., 2004; Sarnowska i wsp., 2009). Na podstawie przedstawionych przykładów można wnioskować o istotnej roli tych organelli w patologii ischemiczno-reperfuzyjnej mózgu. Ponadto, z badań hartowania ischemicznego mięśnia sercowego, ale też z doniesień na temat hartowania ischemicznego mózgu, rysuje się jeszcze jedna funkcja, jaką mogą pełnić mitochondria i wolne rodniki tlenowe.

Wykazano bowiem, że zmniejszenie tworzenia reaktywnych form tlenu w czasie hartowania powodowało zahamowanie powstawania tolerancji na niedokrwienie w kardiomiocytach (Budasz i wsp., 2007). Zatem wydaje się, że mitochondria włączone są zarówno w mechanizmy endogennej protekcji jak i eliminacji komórek tak serca jak i neuronów (Fiskum i wsp., 1999; Dave i wsp., 2001; Perez-Pinzon i wsp., 2005; Murphy i Steenbergen, 2008).

W przedstawionych w tej pracy badaniach starano się poznać udział różnych izoform kinazy białkowej C w mitochondriach w przekazywaniu i rozprzestrzenianiu sygnału ischemiczno-reperfuzyjnego w mózgu.

W prezentowanej pierwszej serii doświadczeń (Ryc.5, strona 43) wykazano dwufazowy przyrost poziomu immunoreaktywności izoform PKC β , δ oraz γ w mitochondriach hipokampów po 5 minutowym epizodzie niedokrwinnym. Niestety nie udało się wykazać jednoznacznej obecności izoformy PKC ϵ w mitochondriach mózgu myszokoczka. Ta izoforma jest typowana jako istotna w mechanizmach hartowania ischemicznego serca i mogłaby okazać się ważna w przebiegu poischemicznej reperfuzji mózgu (Kupsch i wsp., 2007; Yu i wsp., 2008; Pastorino i Hoek, 2008). Pomimo wcześniejszych pozytywnych wyników z przeciwciałami rozpoznającymi PKC ϵ w mózgu myszokoczka, w innych niż mitochondria frakcjach komórkowych (Zablocka i wsp., 2001), żadne z wielu testowanych przeciwciał nie dało zadowalających rezultatów w prowadzonych obecnie badaniach, dlatego też fragmentaryczne wyniki nie zostały zamieszczone w tej rozprawie.

Przedstawiony w pracy w badanym czasie po niedokrwieniu dwufazowy obraz poziomu immunoreaktywności izoform β , δ oraz γ przypomina podobne poischemiczne przebiegi wpływu cytochromu c z mitochondriów, aktywacji kinaz białkowych ERK, JNK czy MLK i może być związany ze zjawiskami rozprzestrzeniania i wzmocnienia sygnału ischemicznego oraz okresem eliminacji bądź regeneracji uszkodzonych komórek w długim czasie reperfuzji (Gu i wsp., 2001; Zablocka i wsp., 2003; Domanska-Janik i wsp., 2004; Yin i wsp., 2005).

Na podstawie pierwszej serii doświadczeń, w której badano wpływ krótkiego niedokrwienia i różnych okresów reperfuzji na poziom immunoreaktywności izoform PKC we frakcji mitochondriów izolowanych z całych hipokampów myszokoczka do dalszych badań wybrano izoformy β , δ oraz γ . Doświadczenia prowadzono w krótkim (30 minut, 1 godzina) i długim (96 godzin) okresie reperfuzji na mitochondriach izolowanych z dwóch różnie reagujących na krótkie niedokrwienie części hipokampa. W modelu przejściowej

ischemii uogólnionej u myszokoczka, po upływie 7 dni od niedokrwienia większość (ponad 80 %) neuronów wrażliwej okolicy CA1 hipokampa ginie, a złożony, wieloczynnikowy proces prowadzący do śmierci opisywany jest jako opóźniona, selektywna, poniedokrwienna śmierć neuronów (Kirino, 1982; Wieloch T. i Kamme F., 1998; Domanska-Janik i wsp., 1999). Jednocześnie sąsiednie rejony hipokampa obejmujące sektory CA2-4 i zakręt zębaty (DG), narażone na ten sam epizod niedokrwienny nie ulegają uszkodzeniu, co może wskazywać na aktywację mechanizmów protekcyjnych w komórkach, pozwalających na przezwycięzenie stresu ischemiczno-reperfuzyjnego.

W mitochondriach izolowanych w dwóch różnie reagujących na czasowe niedokrwienie obszarów hipokampa wykazano, że o ile poziom konwencjonalnej izoformy PKC γ nie zmieniał się istotnie, a obserwowane różnice wynikały prawdopodobnie z cech osobniczych zwierząt, o tyle poziom immunoreaktywności drugiej izoformy z grupy kinaz konwencjonalnych, PKC β , wyraźnie różnił się pomiędzy dwoma obszarami hipokampa w przebiegu reperfuzy. Podobnie, choć odwrotnie, zachowywała się PKC δ , izoforma należąca do podrodziny nowych kinaz białkowych C (Ryc. 6, strona 44). I tak poziom immunoreaktywności PKC β wzrastał w mitochondriach obszaru odpornego na krótkotrwałe niedokrwienia (CA2-4, DG), podczas gdy PKC δ wzrastał w rejonie wrażliwym (CA1). Na podstawie tych danych można pokusić się o postawienie hipotezy o przeciwstawnym zaangażowaniu izoformy β i δ w mitochondriach mózgu w przebiegu reperfuzy po epizodzie niedokrwienym. Na podstawie otrzymanych wyników zakładamy, że PKC β wydaje się być związana z regeneracją i uruchomieniem wewnętrznych mechanizmów adaptacyjnych do sytuacji stresowych, a PKC δ być może jest włączona w proces eliminacji neuronów. Koncepcja ta jest zgodna z doniesieniami dotyczącymi PKC δ , której aktywacja wiązana jest ze zwiększeniem uszkodzenia ischemicznego serca czy procesem apoptozy w komórkach nowotworowych (Liu i wsp., 1999; Liu i wsp., 2003a; He i wsp., 2007; Budas i Mochly-Rosen, 2007). Na temat oddziaływania PKC β z mitochondriami nie ma wielu informacji w dostępnym piśmiennictwie. Badania prowadzone *in vitro* na chondrocytach wskazują na aktywację PKC β I przez wolne rodniki tlenowe, co prowadzi do jej translokacji do frakcji błon komórkowych i uszkodzenia komórek (DelCarlo i Loeser, 2006). Jednak te badania nie wskazują na bezpośrednią translokację PKC β I do mitochondriów. W innych badaniach na komórkach mięśnia sercowego wykazano, że mitochondrialnym substratem PKC β II jest akonitaza (Lin i wsp.,

2009). Aktywność tego enzymu reguluje aktywność szlaku kwasów trójkarboksylowych, a jego modulacja przez fosforylację może wpływać na metabolizm energetyczny mitochondriów. W innych badaniach *in vitro* wykazano, że PKC β oraz δ mogą zmniejszać pobieranie jonów wapnia przez mitochondria tym samym wskazując na zaangażowanie tych kinaz w przekazywanie sygnału wapniowego w komórkach (Pinton i wsp., 2004).

Zatem kolejne badania przedstawione w tej pracy zaplanowano w celu wykazania słuszności, bądź odrzucenia stawianych hipotez o protekcyjnej i degeneracyjnej roli PKC β i δ w mitochondriach.

Badania *in vitro* na komórkach nowotworowych pokazują, że PKC δ oddziałuje z mitochondrialnym enzymem skramblazą fosfolipidów (PLSCR3), który uczestniczy w utrzymaniu homeostazy białkowo-lipidowej błon mitochondrialnych, ale może też uczestniczyć w uwalnianiu białek proapoptotycznych z mitochondriów (Liu i wsp., 2003a). Wcześniejsze badania wykazały ekspresję PLSCR3 w wielu tkankach i narządach, jednak do tej pory nie stwierdzono jej w mózgu (Wiedmer i wsp., 2000). Z drugiej strony, uwalnianie cytochromu c i innych białek proapoptotycznych z mitochondriów jest elementem poniedokrwiennnej śmierci neuronów, jednak mechanizm wypływu białek z mitochondriów nie jest do końca wyjaśniony (Domanska-Janik i wsp., 2004; Halestrap, 2006; Kroemer i wsp., 2007). Dlatego też oddziaływanie PKC δ z białkiem odpowiedzialnym za prawidłową strukturę lipidową błon mitochondrialnych oraz umiejscowienie kardiolipiny w błonach w warunkach fizjologicznych i po indukcji apoptozy wydawało się interesujące oraz warte sprawdzenia. Zatem zbadano czy w mózgu ekspresjonowana jest mitochondrialna izoforma skramblazy fosfolipidów (PLSCR3). Przedstawione w rozprawie badania wykonane trzema uzupełniającymi się metodami wskazują na ekspresję białka PLSCR3 w mózgu oraz lokalizację w mitochondriach. Jak pokazano immunocytochemicznie w mikroskopie elektronowym, PLSCR3 występuje głównie w mitochondriach, ale także z błonie jądrowej, siateczce śródplazmatycznej, plazmalemmie oraz może być związana z mikrotubulami (Kowalczyk i wsp., 2009). Lokalizacja taka jest zgodna z występowaniem w cząsteczce PLSCR3 specyficznych domen i sekwencji przenoszących białka do specyficznych przedziałów komórkowych, które są opisane dla mitochondrialnej skramblazy fosfolipidów, jak też dla pozostałych trzech izoform tego enzymu (Sahu i wsp., 2007).

Badania *in vitro* wskazują, że aktywacja PLSCR3 po indukcji apoptozy powoduje przeniesienie kardiolipiny do zewnętrznej błony mitochondrialnej (Garcia i wsp., 2000; Garcia i wsp., 2002), gdzie staje się miejscem przyłączenia proapoptotycznego białka t-Bid

(proteolityczny, aktywny fragment białka Bid) (Lutter i wsp., 2000; Gonzalvez i wsp., 2005). To z kolei prowadzi do reorganizacji grzebieni mitochondrialnych i wzrostu przepuszczalności zewnętrznej błony dla cytochromu c (Kim i wsp., 2004). Badania nad udziałem 3 izoformy skramblazy fosfolipidów i kardiolipiny w apoptozie indukowanej TNF-alfa wskazują, że nadekspresja PLSCR3 zwiększa, a obniżenie ekspresji zmniejsza ilość kardiolipiny dostępnej dla tBid na powierzchni mitochondriów (Liu i wsp., 2007). W doświadczeniach na ludzkich limfocytach białaczkowych HL-60 traktowanych staurosporyną czy na komórkach U937 poddanych działaniu TNF-alfa wykazano w komórkach apoptotycznych przemieszczenie kardiolipiny do zewnętrznej warstwy wewnętrznej błony mitochondrialnej. Przemieszczenie CL w błonie poprzedzone było pojawieniem się form tlenu, ale występowało wcześniej niż inne markery apoptozy takie jak przemieszczenie fosfolipidów na zewnątrz plazmalemmy, obniżenie potencjału mitochondrialnego czy fragmentacja DNA (Garcia i wsp., 2002). Proapoptotyczna aktywacja PLSCR3 związana jest z fosforylacją przez PKC δ , jak pokazano *in vitro* na komórkach HeLa (Liu i wsp., 2003a). Prezentowane w niniejszej pracy dane o ko-immunoprecypitacji PKC δ i PLSCR3 z mitochondriów izolowanych z hipokampów po niedokrwieniu oraz mitochondrialna kolokalizacja w rejonie CA1 hipokampa obserwowana w mikroskopie elektronowym po niedokrwieniu i reperfuzji wskazują, że oba te białka wspólnie występują w mitochondriach neuronów i prawdopodobnie mogą uczestniczyć w mechanizmie prowadzącym do uwolnienia cytochromu c, podobnie jak było to wcześniej opisane *in vitro*. Niezależnie od znalezienia kolokalizacji PKC δ i PLSCR3 niemal wyłącznie w obszarze CA1 hipokampa po ischemii, poziom immunoreaktywności t-Bid nie różnił się pomiędzy CA1 a obszarem CA2-4, DG. Prawdopodobnie przeniesienie t-Bid do mitochondriów nie jest wystarczające do uwolnienia białek proapoptotycznych z mitochondriów i jest tylko jednym z wielu elementów procesu prowadzącego do eliminacji bądź regeneracji uszkodzonych komórek. Wydaje się jednak, że można sugerować, iż poischemiczny wzrost immunoreaktywności PKC δ w mitochondriach w rejonie wrażliwym na niedokrwienie wiąże się ze wzrostem przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej dla cytochromu c i procesem eliminacji neuronów. Uwalnianie cytochromu c z mitochondriów oraz aktywacja kaspaz są uznanymi elementami poniedokrwiennej opóźnionej śmierci neuronów (Ouyang i wsp., 1999; Li i wsp., 2001; Domanska-Janik i wsp., 2004; Chaitanya i Babu, 2008). Kolejnego dowodu na poparcie hipotezy o udziale PKC δ w poischemicznym uszkodzeniu komórek dostarczają doświadczenia *in vitro*, gdzie aktywacja PKC δ przez H_2O_2 i przeniesienie

enzymu do mitochondriów skutkuje obniżeniem potencjału błony mitochondrialnej i wypływem cytochromu c (Majumder i wsp., 2001). Natomiast zahamowanie PKC δ przez selektywny, peptydowy inhibitor deltaV1-1, redukowało uszkodzenie komórek w hodowli organotypowej skrawków hipokampa szczura w modelu OGD (ang. *oxygen-glucose deprivation*) oraz gdy inhibitor podany był do mózgu obniżał obszar uszkodzenia ogniskowego *in vivo* w modelu przejściowego zamknięcia tętnicy środkowej mózgu szczura (Bright i wsp., 2004). Podczas gdy zahamowanie PKC δ wydaje się być neuro- i kardioprotekcyjne to są także doniesienia mówiące o pozytywnym wpływie mitochondrialnie umiejscowionej PKC δ w mięśniu sercowym (Mayr i wsp., 2009). Myszy pozbawione genu kodującego PKC δ nie tylko nie reagowały cytoprotekcją na hartowanie ischemiczne serca, ale obszar uszkodzenia był większy niż u myszy dzikich (Mayr i wsp., 2004). Jednak wydaje się, że różne skutki aktywacji izoform PKC mogą być wynikiem różnych warunków doświadczenia w różnych modelach badawczych, w różnych tkankach czy też odzwierciedlać skutki manipulacji genetycznych *in vitro*. Sądzi się także, że ubytki jednej izoformy PKC mogą być kompensowane przez pozostałe izoformy (Mayr i wsp., 2009).

Jak wynika z badań własnych oraz piśmiennictwa, aktywacja PKC związana z mitochondriami występuje zarówno w aktywacji mitochondrialnej ścieżki apoptozy jak i w cytoprotekcji (Garg i Hu, 2007; Agnetti i wsp., 2007). Zatem w kolejnym etapie badań podjęto próby weryfikacji hipotezy, że poischemiczny wzrost poziomu immunoreaktywności PKC β w mitochondriach może być związany z uruchomieniem mechanizmów regeneracji komórek w obszarze CA2-4, DG hipokampa po 5 minutowym epizodzie niedokrwinnym. Istnieją dowody wskazujące, że w procesie ischemicznego hartowania mięśnia sercowego i mózgu istotną rolę odgrywa aktywacja PKC ϵ i jej oddziaływanie z mitochondriami. Jednym z białek typowanych jako substrat PKC ϵ jest mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP (Raval i wsp., 2007), ale także kompleks białkowy MPTP (Baines i wsp., 2003) czy podjednostka IV oksydazy cytochromowej (Ogbi i wsp., 2004; Barnett i wsp., 2008). Ponadto ostatnie badania z zastosowaniem metod proteomicznych i metabolomicznych wskazują, że aktywna PKC ϵ modyfikuje metabolizm energetyczny mięśnia sercowego, co prowadzi do spowolnienia zaniku związków wysokoenergetycznych w czasie ischemii oraz szybszą regenerację po przywróceniu krążenia (Mayr i wsp., 2009). Ciekawy jest też fakt, że w sytuacji zahamowania aktywności PKC ϵ obserwowano mitochondrialną translokację PKC δ i efekt cytoprotekcyjny, co badacze tłumaczą kompensacją funkcji PKC ϵ przez PKC δ , która

oddziałuje z mitochondrialnym kompleksem dehydrogenazy pirogronianowej - kluczowym enzymem łączącym glikolizę z mitochondriami (Mayr i wsp., 2009). W badaniach na pierwotnej hodowli mysich neuronów i astrocytów wykazano, że specyficzne zahamowanie PKC ϵ i β 1 nasilało uszkodzenie komórek w modelu OGD ischemii *in vitro*, przy czym aktywność PKC ϵ miała większe znaczenie dla przeżycia neuronów, a PKC β 1 astrocytów (Wang i wsp., 2004). Autorzy sugerują, że różne izoformy PKC mogą mieć różne znaczenie w różnych typach komórek w uszkodzeniu ischemicznym. W wykorzystanym w tej dysertacji modelu przejściowego niedokrwienia mózgu myszokoczka opóźniona śmiercią neuronów występuje w polu CA1 hipokampa przy zachowaniu prawidłowej struktury CA2-4 i zakrętu zębatego, co korelowało ze wzrostem poziomu immunoreaktywności PKC β w mitochondriach (Ryc. 6, strona 44). Kolejne badania wykazały, że zahamowanie PKC β nasila uszkodzenie hipokampa w modelu uszkodzenia ekscytotoksycznego *in vitro* (Ryc. 13, strona 52). Zatem wydaje się, że poischemiczna, mitochondrialna lokalizacja PKC β może być związana z regeneracją komórek w mechanizmie uwzględniającym oddziaływanie z białkami np. kanałów jonowych czy łańcucha oddechowego.

Poszukiwanie mitochondrialnych substratów PKC β metodą elektrofizjologiczną wykazało istnienie w mitochondriach hipokampa myszokoczka nowego kanału potasowego regulowanego napięciem o częściowych właściwościach farmakologicznych dla kanału Kv1.3. Obecność kanałów potasowych w mitochondriach mózgu jest dobrze udokumentowana (Debska i wsp., 2001; Skalska i wsp., 2009), jednak obecność kanału Kv1.3 była dotychczas wykazana tylko dla mitochondriów w limfocytach (Szabo i wsp., 2005). Kanał Kv1.3 w błonie plazmatycznej może tworzyć kompleksy z białkiem adaptorowym nShc oraz oddziałuje z białkiem Grb10, a jego aktywacja modulowana jest przez te białka oraz przez fosforylację reszt tyrozyny (Colley i wsp., 2009). O ile występowanie kanału Kv1.3 w mitochondriach mózgu wydaje się być dobrze opisane naszymi badaniami elektrofizjologicznymi i immunohistochemicznymi, o tyle oddziaływanie PKC β 1 z tym kanałem wymaga dalszych analiz. Pierwsze doświadczenia wskazują na hamowanie aktywności i zamknięcie kanału przez PKC β 1. Nie wiemy, jaki jest charakter oddziaływań pomiędzy białkami oraz na czym polega brak odwracalności tego zjawiska. Znaczenie fizjologiczne tej obserwacji jest trudne do wyjaśnienia w świetle wielu badań wskazujących, że to otwarcie mitochondrialnych kanałów potasowych jest protekcyjne w uszkodzeniu ischemiczno-reperfuzyjnym (Xu i wsp., 2002; Lebuffe i wsp., 2003; Budas i wsp., 2007). Otwarcie mitochondrialnych kanałów potasowych związane

jest z obniżeniem produkcji reaktywnych form tlenu, a więc może zmniejszać uszkodzenie w czasie reperfuzji. Z drugiej jednak strony pewien poziom ROS jest niezbędny do wytworzenia zjawiska hartowania ischemicznego (Lebuffe i wsp., 2003), zatem może obserwowane przez nas zamknięcie Kv1.3 pod wpływem PKC β I jest elementem modulacji poziomu reaktywnych form tlenu w mitochondriach mózgu. Istnieją jednak badania wskazujące, że zahamowanie aktywności Kv1.3 przez białko Bax może prowadzić do uszkodzenia limfocytów (Szabo i wsp., 2008). Zatem wydaje się, że potrzebne są dalsze badania wpływu PKC β I, ale też PKC β II, na aktywność odkrytego kanału potasowego aby zweryfikować hipotezę o udziale tych białek w regeneracji komórek hipokampa w uszkodzeniu ischemiczno-reperfuzyjnym.

W kolejnym podejściu metodycznym zmierzającym do znalezienia mitochondrialnych białek oddziałujących z PKC β I wykorzystującym chromatografię powinowactwa i analizę metodą spektrometrii mas znaleziono szereg białek potencjalnie oddziałujących z interesującym nas enzymem (Tabela 10, strona 62).

Głównym białkiem, które wydaje się specyficznym oddziaływać z PKC β I jest mitochondrialna kinaza kreatynowa (Mt-CK). Mt-CK zlokalizowana jest przy zewnętrznej błonie mitochondrialnej oddziałuje z VDAC oraz translokazą nukleotydów adeninowych (ANT) i bierze udział w utrzymaniu komórkowej homeostazy ATP (Berg i wsp., 2007). Kinaza kreatynowa jest też prawdopodobnie zaangażowana w regulację przepuszczalności megakanalu mitochondrialnego MPTP, którego otwarcie wydaje się być elementem mechanizmu eliminacji neuronów podczas ischemicznego uszkodzenia mózgu (Kroemer i wsp., 2007). Również białko ANT wydaje się oddziaływać z PKC β I, chociaż jeśli oba białka tworzą kompleks to nie możemy wykluczyć, że tylko jedno z nich oddziałuje z PKC β I (Halestrap i Brennerb, 2003). Podstawową funkcją translokazy ATP-ADP jest sprzężanie przepływu ATP i ADP przez błonę mitochondrialną. Enzym jest dimerem zbudowanym z dwóch identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej 30 kDa, ma jedno miejsce wiązania nukleotydów, które na przemian oddziałuje raz z macierzową, a raz z cytoplazmatyczną stroną wewnętrznej błony mitochondrialnej (Berg i wsp., 2007). Zahamowanie aktywności ANT natychmiast zatrzymuje aktywność łańcucha oddechowego, co świadczy o wielkim znaczeniu translokazy. Wysokie współczynniki „520” i „259” przypisane odpowiednio sekwencjom Mt-CK i ANT w analizie programem Mascot wskazują na wysokie prawdopodobieństwo, że Mt-CK i ANT nieprzypadkowo znalazły się w obecności PKC β I w analizowanej próbce wydaje się być występowanie

reszt seryny i treoniny w cząsteczkach ANT, które być może mogą być fosforylowane przez PKC β .

Kolejne białka wykryte w kompleksach z PKC β 1 to dehydrogenazy jabłczanowa i izocytrynianowa, które są enzymami cyklu Krebsa w macierzy mitochondrialnej i przenoszą równoważniki redukcyjne na nikotynoamidoadeninowy dinukleotyd NAD^+ , tworząc jego zredukowaną formę NADH . Dehydrogenaza izocytrynianowa jest stymulowana allosterycznie przez ADP, który zwiększa powinowactwo enzymu do substratów, natomiast NADH i ATP hamują jego działanie. Szybkość tworzenia α -ketoglutaranu z izocytrynianu decyduje o szybkości działania całego cyklu kwasów trójkarboksylowych. Dehydrogenaza jabłczanowa ostatecznie utlenia jabłczan do szczawiooctanu, a akceptorem wodorów w tej reakcji jest również NAD^+ . Cząsteczki NADH utworzone w cyklu kwasu cytrynowego są utleniane w łańcuchu oddechowym.

Oksydoreduktaza NADH -ubichinon (nazywana też dehydrogenazą NADH lub kompleksem I łańcucha oddechowego) jest pierwszym wielkim kompleksem białkowym zlokalizowanym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, który wprowadza elektrony z NADH w łańcuch elektronowy. Kompleks o masie 880 kDa składa się z 46 podjednostek i katalizuje reakcję przeniesienia dwóch elektronów z NADH na ubichinon – niskocząsteczkowy przenośnik równoważników redukcyjnych. Ostatnie badania mitochondrialnego fosfoproteomu w komórkach serca i wątroby wykazały fosforylację podjednostek o masach 75, 51, 42, 23 i 13 kDa z kompleksu I (Aponte i wsp., 2009).

W mieszaninie białek wykrytych w chromatografii powinowactwa z PKC β 1 znalazły się też podjednostki α i β kompleksu F_1 ATPazy mitochondrialnej znajdujące się w macierzy mitochondrialnej, która katalizuje reakcję wytwarzania ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego P_i . Kompleks F_1 zawiera pięć rodzajów łańcuchów polipeptydowych o stechiometrii $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Zgodnie z modelem konformacyjnego mechanizmu syntezy ATP Boyera trzy podjednostki β zawierające miejsca katalityczne wiążące ADP, P_i i ATP znajdują się w różnych funkcjonalnie, nie równoważnych stanach konformacyjnych (Boyer, 1997). Przejścia konformacyjne są powiązane najprawdopodobniej przez zmiany w oddziaływaniu pomiędzy podjednostkami. Fosforylację podjednostek alfa, beta, gamma i delta kompleksu F_1 - F_0 ATP-azy zostały ostatnio wykazane metodą znakowania ^{32}P aktywnych mitochondriów w komórkach serca i wątroby (Aponte i wsp., 2009). Co ciekawe, defosforylacja seryny podjednostki alfa F_1 - F_0 ATP-azy wykazano w warunkach deenergizacji mitochondriów (Boja i wsp., 2009). Badania te sugerują regulację aktywności tego białka przez fosforylację/defosforylację.

Białka tworzące kompleks I i F_1-F_0 ATP-azę odgrywają kluczową rolę w regulacji oksydacyjnej fosforylacji, a stopień ufosforylowania białek wydaje się pełnić rolę regulującą aktywność całego łańcucha oddechowego.

Dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanu (G3P-DH) jest enzymem zlokalizowanym w zewnętrznej powierzchni wewnętrznej błony mitochondrialnej, który pośredniczy w przenoszeniu przez błonę mitochondrialną elektronów z cytoplazmatycznego NADH powstałego w trakcie glikolizy. Glicerolo-3-fosforan zostaje utleniony do fosfodihydroksyacetonu na zewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej, w rezultacie przeniesienia pary elektronów na FAD – grupę prostetyczną dehydrogenazy glicerolowej, transbłonowego enzymu, który zamyka cykl przeniesienia elektronów z cytoplazmy do macierzy mitochondrialnej.

Tioredoksyna (Trx) to wysoko konserwowane ewolucyjnie białko o masie 12 kDa tworzące kompleks z reduktazą tioredoksyny (TR) oraz NADPH. Bierze udział w redukcji mostków dwusiarczkowych do grup hydrosulfidowych kontrolując stan oksydo-redukcyjny w komórce dzięki swoim grupom sulfhydrylowym; uczestniczy m.in. w usuwaniu reaktywnych form tlenu.

Wszystkie opisane powyżej białka uczestniczą w metabolizmie energetycznym komórek i mogą wpływać na tworzenie reaktywnych form tlenu. Można przypuszczać, że regulacja metabolizmu glukozy, utrzymanie homeostazy związków wysokoenergetycznych odgrywa istotną rolę w procesach regeneracyjnych w epizodach ischemiczno-reperfuzyjnych. Ostatnio prowadzone metodami proteomicznymi badania wskazują, że kardioprotekcja związana jest z przebudową metabolizmu glukozy oraz regulacją tego procesu przez PKC ϵ i δ w mięśniu sercowym myszy (Mayr i wsp., 2009). Nasze badania być może staną się początkiem szerszych analiz tego obszaru metabolizmu komórek mózgu w procesie poniedokrwiennej śmierci neuronów. Istnieją przesłanki, że posttranslacyjne modyfikacje wielu białek mitochondrialnych wpływają na cytoplazmatyczną i mitochondrialną homeostazę energetyczną w różnych stanach fizjologicznych, chociaż zagadnienie to wymaga wielu dalszych badań (Balaban, 2009).

Przedstawione w tej pracy wyniki rodzą wiele pytań i wydaje się, że na ich podstawie można planować kolejne doświadczenia. Po pierwsze, trzeba potwierdzić innymi metodami wyniki otrzymane metodą chromatografii powinowactwa i analizą spektrometrii mas oraz zbadać skutki oddziaływania tych białek z PKC. Należy zweryfikować czy kanał potasowy Kv1.3 jest regulowany przez PKC β i co taka regulacja

oznacza dla komórki. Co ciekawe, żaden kanał jonowy nie został wykryty w chromatografii powinowactwa z PKC β I, może zatem odkrycie nowego kanału w błonie mitochondrialnej jest zdarzeniem niezależnym od poischemicznej translokacji PKC β do mitochondriów. Kolejnych badań wymaga też obecność izoformy PKC β II w mitochondriach. W naszych doświadczeniach Western Blot przeciwciała anti-PKC β nie rozróżniało dwóch izoform tej podjednostki, które różnią się niewielkim odcinkiem w części C-końcowej polipeptydu (Blobe i wsp., 1996), zatem obie izoformy PKC β mogą z równym prawdopodobieństwem brać udział w modulacji poniedokrwiennej funkcji mitochondriów. Kolejnym pytaniem jest mechanizm przechodzenia PKC i innych kinaz białkowych przez błony mitochondrialne.

Wydaje się, że poznanie endogennych mechanizmów protekcyjnych uruchamianych w czasie epizodu ischemiczno-reperfuzyjnego może wskazać nowe miejsca ingerencji farmakologicznych, które mogą polegać na wzmocnieniu naturalnych procesów ochronnych.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

► Krótki epizod niedokrwienny mózgu powoduje specyficzne przemieszczenie izoform delta i beta kinazy białkowej C do mitochondriów w hipokampie myszokoczka mongolskiego. Poziom immunoreaktywności PKC δ rośnie we wrażliwym na niedokrwienie rejonie CA1, a PKC β we względnie odpornym na krótki epizod ischemiczny obszarze obejmującym CA2-4 i DG.

► W mitochondriach mózgu myszokoczka PKC δ tworzy kompleks z enzymem PLSCR3 odpowiedzialnym za rozmieszczenie kardiolipiny w błonach mitochondrium.

► PKC β w mitochondriach wydaje się oddziaływać z białkami, które tworzą łańcuch oddechowy, megakanal oraz regulują przenoszenie elektronów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną.

Sugerujemy, że izoformy delta i beta PKC mogą pełnić role w integrowaniu sygnału ischemicznego-reperfuzyjnego w mitochondriach mózgu:

► PKC δ może być związana z przebudową błon mitochondrialnych, która może prowadzić do uwolnienia cytochromu c i apoptozy;

► PKC β może brać udział w endogennym mechanizmie protekcji/regeneracji komórek hipokampa po krótkim epizodzie niedokrwiennym, który w badanym modelu obserwowany jest w rejonie CA2-4, DG. Białka, z którymi oddziałuje PKC β wydają się być związane z metabolizmem glukozy, budowaniem potencjału elektrochemicznego wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz produkcją i usuwaniem wolnych rodników w mitochondriach.



7. LITERATURA

1. Agnetti G., Kane L.A., Guarnieri C., Caldarera C.M., Van Eyk J.E. Proteomic technologies in the study of kinases: novel tools for the investigation of PKC in the heart. *Pharmacol.Res.* (2007), 55(6):511-522.
2. Aponte A.M., Phillips D., Hopper R.K., Johnson D.T., Harris R.A., Blinova K., Boja E.S., French S., Balaban R.S. Use of $(32)P$ to study dynamics of the mitochondrial phosphoproteome. *J.Proteome.Res.* (2009), 8(6):2679-2695.
3. Aronowski J., Grotta J.C., Strong R., Waxham M.N. Interplay between the gamma isoform of PKC and calcineurin in regulation of vulnerability to focal cerebral ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab* (2000), 20(2):343-349.
4. Baines C.P., Song C.X., Zheng Y.T., Wang G.W., Zhang J., Wang O.L., Guo Y., Bolli R., Cardwell E.M., Ping P. Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ.Res.* (2003), 92(8):873-880.
5. Balaban R.S. Domestication of the cardiac mitochondrion for energy conversion. *J.Mol.Cell Cardiol.* (2009), 46(6):832-841.
6. Barnett M., Lin D., Akoyev V., Willard L., Takemoto D. Protein kinase C epsilon activates lens mitochondrial cytochrome c oxidase subunit IV during hypoxia. *Exp.Eye Res.* (2008), 86(2):226-234.
7. Bednarczyk P., Dolowy K., Szewczyk A. Matrix Mg^{2+} regulates mitochondrial ATP-dependent potassium channel from heart. *FEBS Lett.* (2005), 579(7):1625-1632.
8. Beresewicz M., Kowalczyk J.E., Zablocka B. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate and ryanodine receptors in vivo after transient brain ischemia in gerbils. *Neurochem.Int.* (2006), 48(6-7):568-571.
9. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. *Biochemia.* (2007), Wydanie III, Wydawnictwo Naukowe PWN.
10. Blobel G.C., Stribling D.S., Fabbro D., Stabel S., Hannun Y.A. Protein kinase C beta II specifically binds to and is activated by F-actin. *Journal of Biological Chemistry* (1996), 271(26):15823-15830.

11. Boja E.S., Phillips D., French S.A., Harris R.A., Balaban R.S. Quantitative mitochondrial phosphoproteomics using iTRAQ on an LTQ-Orbitrap with high energy collision dissociation. *J. Proteome. Res.* (2009), 8(10):4665-4675.
12. Bolender N., Sickmann A., Wagner R., Meisinger C., Pfanner N. Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep.* (2008), 9(1):42-49.
13. Boyer P.D. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* (1997), 66:717-749.
14. Bright R., Raval A.P., Dembner J.M., Perez-Pinzon M.A., Steinberg G.K., Yenari M.A., Mochly-Rosen D. Protein kinase C delta mediates cerebral reperfusion injury in vivo. *Journal of Neuroscience* (2004), 24(31):6880-6888.
15. Budas G.R., Churchill E.N., Mochly-Rosen D. Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol. Res.* (2007), 55(6):523-536.
16. Budas G.R. i Mochly-Rosen D. Mitochondrial protein kinase Cepsilon (PKCepsilon): emerging role in cardiac protection from ischaemic damage. *Biochem. Soc. Trans.* (2007), 35(Pt 5):1052-1054.
17. Cardell M., Bingren H., Wieloch T., Zivin J., Saitoh T. Protein kinase C is translocated to cell membranes during cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* (1990), 119(2):228-232.
18. Chaitanya G.V. i Babu P.P. Activation of calpain, cathepsin-b and caspase-3 during transient focal cerebral ischemia in rat model. *Neurochem Res.* (2008), 33(11):2178-2186.
19. Colley B.S., Cavallin M.A., Biju K., Marks D.R., Fadool D.A. Brain-derived neurotrophic factor modulation of Kv1.3 channel is dysregulated by adaptor proteins Grb10 and nShc. *BMC. Neurosci.* (2009), 108-.
20. Corbalan-Garcia S. i Gomez-Fernandez J.C. Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* (2006), 1761(7):633-654.
21. Cory S. i Adams J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* (2002), 2(9):647-656.
22. Costa A.D., Pierre S.V., Cohen M.V., Downey J.M., Garlid K.D. cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria. *Cardiovasc. Res.* (2008), 77(2):344-352.

23. Csukai M., Chen C.H., De Matteis M.A., Mochly-Rosen D. The coatomer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase Cepsilon. *Journal of Biological Chemistry* (1997), 272(46):29200-29206.
24. Czlonkowska A. Dlaczego nie ma skutecznego leczenia neuroprotekcijnego? *Polski Przegląd Neurologiczny* (2008), 4(supl. A):20-21.
25. Dave K.R., Saul I., Busto R., Ginsberg M.D., Sick T.J., Perez-Pinzon M.A. Ischemic preconditioning preserves mitochondrial function after global cerebral ischemia in rat hippocampus. *J.Cereb.Blood Flow Metab* (2001), 21(12):1401-1410.
26. Debska G., May R., Kicinska A., Szewczyk A., Elger C.E., Kunz W.S. Potassium channel openers depolarize hippocampal mitochondria. *Brain Res.* (2001), 892(1):42-50.
27. DelCarlo M. i Loeser R.F. Chondrocyte cell death mediated by reactive oxygen species-dependent activation of PKC-beta1. *Am.J.Physiol Cell Physiol* (2006), 290(3):C802-C811.
28. Denning M.F., Wang Y., Tibudan S., Alkan S., Nickoloff B.J., Qin J.Z. Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase C. *Cell Death.Differ.* (2002), 9(1):40-52.
29. Dluzniewska J., Sarnowska A., Beresewicz M., Johnson I.P., Srani S.K.S., Ramesh B., Goldspink G., Gorecki D.C., Zablocka B. A strong neuroprotective effect of the autonomous C-terminal peptide of IGF-1 Ec (MGF) in brain ischemia. *FASEB J* (2005), 19(13):1896-1898.
30. Domanska-Janik K., Bong P., Bronisz-Kowalczyk A., Zajac H., Zablocka B. API transcriptional factor activation and its relation to apoptosis of hippocampal CA1 pyramidal neurons after transient ischemia in gerbils. *J Neurosci.Res.* (1999), 57(6):840-846.
31. Domanska-Janik K., Buzanska L., Dluzniewska J., Kozłowska H., Sarnowska A., Zablocka B. Neuroprotection by cyclosporin A following transient brain ischemia correlates with the inhibition of the early efflux of cytochrome C to cytoplasm. *Brain Res.Mol Brain Res.* (2004), 121(1-2):50-59.
32. Domanska-Janik K., Lazarewicz J., Noremberg K., Strosznajder J., Zalewska T. Metabolic disturbances of synaptosomes isolated from ischemic gerbil brain. *Neurochem Res* (1985), 10(5):649-665.

33. Domanska-Janik K. i Zablocka B. Protein kinase C as an early and sensitive marker of ischemia-induced progressive neuronal damage in gerbil hippocampus. *Mol Chem.Neuropathol.* (1993), 20(2):111-123.
34. Domanska-Janik K. i Zalewska T. Effect of brain ischemia on protein kinase C. *J.Neurochem* (1992), 58(4):1432-1439.
35. Durkin J.P., Tremblay R., Buchan A., Blosser J., Chakravarthy B., Mealing G., Morley P., Song D. An early loss in membrane protein kinase C activity precedes the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J.Neurochem.* (1996), 66(3):951-962.
36. Eklof B. i Siesjo B.K. The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain. *Acta Physiol Scand.* (1972), 86(2):155-165.
37. Fernandez E., Cuenca N., Garcia M., De Juan J. Two types of mitochondria are evidenced by protein kinase C immunoreactivity in the Muller cells of the carp retina. *Neurosci.Lett.* (1995), 183(3):202-205.
38. Fiskum G. Involvement of mitochondria in ischemic cell injury and in regulation of intracellular calcium. *Am.J Emerg.Med.* (1983), 1(2):147-153.
39. Fiskum G. Mitochondrial damage during cerebral ischemia. *Ann.Emerg.Med.* (1985), 14(8):810-815.
40. Fiskum G., Murphy A.N., Beal M.F. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J.Cereb.Blood Flow Metab* (1999), 19(4):351-369.
41. Folbergrova J., Li P.A., Uchino H., Smith M.L., Siesjo B.K. Changes in the bioenergetic state of rat hippocampus during 2.5 min of ischemia, and prevention of cell damage by cyclosporin A in hyperglycemic subjects. *Exp.Brain Res.* (1997), 114(1):44-50.
42. Frazier A.E., Chacinska A., Truscott K.N., Guiard B., Pfanner N., Rehling P. Mitochondria use different mechanisms for transport of multispinning membrane proteins through the intermembrane space. *Mol.Cell Biol.* (2003), 23(21):7818-7828.
43. Friberg H., Wieloch T., Castilho R.F. Mitochondrial oxidative stress after global brain ischemia in rats. *Neurosci.Lett.* (2002), 334(2):111-114.

44. Gadamski R. i Mossakowski M.J. Asymatric damage of the CA1 sector of ammon's horn after short-term forebrain ischemia in Mongolian gerbils. *Neropatologia Polska* (1992), 30((3/4)):209-219.
45. Garcia F.M., Troiano L., Moretti L., Nasi M., Pinti M., Salvioli S., Dobrucki J., Cossarizza A. Early changes in intramitochondrial cardiolipin distribution during apoptosis. *Cell Growth Differ.* (2002), 13(9):449-455.
46. Garcia F.M., Troiano L., Moretti L., Pedrazzi J., Salvioli S., Castilla-Cortazar I., Cossarizza A. Changes in intramitochondrial cardiolipin distribution in apoptosis-resistant HCW-2 cells, derived from the human promyelocytic leukemia HL-60. *FEBS Lett.* (2000), 478(3):290-294.
47. Garg V. i Hu K. Protein kinase C isoform-dependent modulation of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondrial inner membrane. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* (2007), 293(1):H322-H332.
48. Gasecki D., Kozera G., Swierkocka-Miastkowska M., Nyka W.M. Aktualności w leczeniu ostrej fazy udaru niedokrwienego mózgu. *Choroby Serca i Naczyń* (2006), 3(4):181-185.
49. Gonzalvez F., Pariselli F., Dupaigne P., Budihardjo I., Lutter M., Antonsson B., Diolez P., Manon S., Martinou J.C., Gubern M., Wang X., Bernard S., Petit P.X. tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak. *Cell Death.Differ.* (2005), 12(6):614-626.
50. Grieb P. Szanse na skuteczne neuroprotecyjne leczenie udaru niedokrwienego mózgu. (2005), 237-260.
51. Gu Z., Jiang Q., Zhang G. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in hippocampus after cerebral ischemia may not interfere with postischemic cell death. *Brain Res.* (2001), 901(1-2):79-84.
52. Halestrap A.P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem.Soc.Trans.* (2006), 34(Pt 2):232-237.
53. Halestrap A.P. i Brennerb C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr.Med.Chem.* (2003), 10(16):1507-1525.
54. Halestrap A.P., Clarke S.J., Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim.Biophys.Acta* (2007), 1767(8):1007-1031.
55. Halestrap A.P., McStay G.P., Clarke S.J. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* (2002), 84(2-3):153-166.

56. He Y., Liu J., Grossman D., Durrant D., Sweatman T., Lothstein L., Epand R.F., Epand R.M., Lee R.M. Phosphorylation of mitochondrial phospholipid scramblase 3 by protein kinase C-delta induces its activation and facilitates mitochondrial targeting of tBid. *J.Cell Biochem.* (2007).
57. Hu B.R., Janelidze S., Ginsberg M.D., Busto R., Perez-Pinzon M., Sick T.J., Siesjo B.K., Liu C.L. Protein aggregation after focal brain ischemia and reperfusion. *J.Cereb.Blood Flow Metab* (2001), 21(7):865-875.
58. Hu B.R., Park M., Martone M.E., Fischer W.H., Ellisman M.H., Zivin J.A. Assembly of proteins to postsynaptic densities after transient cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience* (1998), 18(2):625-633.
59. Inagaki K., Hahn H.S., Dorn G.W., Mochly-Rosen D. Additive protection of the ischemic heart ex vivo by combined treatment with delta-protein kinase C inhibitor and epsilon-protein kinase C activator. *Circulation* (2003), 108(7):869-875.
60. Jaburek M., Costa A.D., Burton J.R., Costa C.L., Garlid K.D. Mitochondrial PKC epsilon and mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel copurify and coreconstitute to form a functioning signaling module in proteoliposomes. *Circ.Res.* (2006), 99(8):878-883.
61. Jimenez B. i Tapia R. Biochemical modulation of NMDA receptors: role in conditioned taste aversion. *Neurochem Res* (2004), 29(1):161-168.
62. Kim T.H., Zhao Y., Ding W.X., Shin J.N., He X., Seo Y.W., Chen J., Rabinowich H., Amoscato A.A., Yin X.M. Bid-cardiolipin interaction at mitochondrial contact site contributes to mitochondrial cristae reorganization and cytochrome C release. *Mol.Biol.Cell* (2004), 15(7):3061-3072.
63. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* (1982), 239(1):57-69.
64. Kobayashi H., Miura T., Ishida H., Miki T., Tanno M., Yano T., Sato T., Hotta H., Shimamoto K. Limitation of infarct size by erythropoietin is associated with translocation of Akt to the mitochondria after reperfusion. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* (2008), 35(7):812-819.
65. Korpachev V.G., Lysenkov S.P., Tel' L.Z. Modeling clinical death and postresuscitation disease in rats]. *Patol.Fiziol.Eksp.Ter.* (1982), (3):78-80.
66. Kowalczyk J.E., Beresewicz M., Gajkowska B., Zablocka B. Association of protein kinase C delta and phospholipid scramblase 3 in hippocampal mitochondria

- correlates with neuronal vulnerability to brain ischemia. *Neurochem Int.* (2009), 55(1-3):157-163.
67. Krajewski S., Mai J.K., Krajewska M., Sikorska M., Mossakowski M.J., Reed J.C. Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience* (1995), 15(10):6364-6376.
68. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* (2007), 87(1):99-163.
69. Kupsch K., Parvez S., Siemen D., Wolf G. Modulation of the permeability transition pore by inhibition of the mitochondrial K(ATP) channel in liver vs. brain mitochondria. *J.Membr.Biol.* (2007), 215(2-3):69-74.
70. Lasfer M., Davenne L., Vadrot N., Alexia C., Sadji-Ouatas Z., Bringuier A.F., Feldmann G., Pessayre D., Reyl-Desmars F. Protein kinase PKC delta and c-Abl are required for mitochondrial apoptosis induction by genotoxic stress in the absence of p53, p73 and Fas receptor. *FEBS Lett.* (2006), 580(11):2547-2552.
71. Lazarewicz J. Pobudzające receptory w niedokrwieniu mózgu. (2000), 109-120.
72. Lazarewicz J.W. i Salinska E. Udział jonów wapnia w patologii niedokrwiennej mózgu. (2005), (2):16-46.
73. Lebuffe G., Schumacker P.T., Shao Z.H., Anderson T., Iwase H., Vanden Hoek T.L. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* (2003), 284(1):H299-H308.
74. Li L., Lorenzo P.S., Bogi K., Blumberg P.M., Yuspa S.H. Protein kinase Cdelta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector. *Mol.Cell Biol.* (1999), 19(12):8547-8558.
75. Li P., He Q.P., Ouyang Y.B., Liu C.L., Hu B.R., Siesjo B.K. Early release of cytochrome C and activation of caspase-3 in hyperglycemic rats subjected to transient forebrain ischemia. *Brain Res.* (2001), 896(1-2):69-76.
76. Lin G., Brownsey R.W., MacLeod K.M. Regulation of mitochondrial aconitase by phosphorylation in diabetic rat heart. *Cell Mol.Life Sci.* (2009), 66(5):919-932.
77. Liu G.S., Cohen M.V., Mochly-Rosen D., Downey J.M. Protein kinase C-epsilon is responsible for the protection of preconditioning in rabbit cardiomyocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.* (1999), 31(10):1937-1948.

78. Liu J., Chen J., Dai Q., Lee R.M. Phospholipid scramblase 3 is the mitochondrial target of protein kinase C delta-induced apoptosis. *Cancer Res* (2003a), 63(6):1153-1156.
79. Liu J., Dai Q., Chen J., Durrant D., Freeman A., Liu T., Grossman D., Lee R.M. Phospholipid scramblase 3 controls mitochondrial structure, function, and apoptotic response. *Mol Cancer Res* (2003b), 1(12):892-902.
80. Liu J., Epand R.F., Durrant D., Grossman D., Chi N.W., Epand R.M., Lee R.M. Role of phospholipid scramblase 3 in the regulation of tumor necrosis factor- α -induced apoptosis. *Biochemistry* (2007), 47(15):4518-4529.
81. Liu J., Weiss A., Durrant D., Chi N.W., Lee R.M. The cardiolipin-binding domain of Bid affects mitochondrial respiration and enhances cytochrome c release. *Apoptosis*. (2004), 9(5):533-541.
82. Lowry O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* (1951), 193(1):265-275.
83. Lutter M., Fang M., Luo X., Nishijima M., Xie X., Wang X. Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat.Cell Biol.* (2000), 2(10):754-761.
84. Majumder P.K., Mishra N.C., Sun X., Bharti A., Kharbanda S., Saxena S., Kufe D. Targeting of protein kinase C delta to mitochondria in the oxidative stress response. *Cell Growth Differ.* (2001), 12(9):465-470.
85. Majumder P.K., Pandey P., Sun X., Cheng K., Datta R., Saxena S., Kharbanda S., Kufe D. Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol.Chem.* (2000), 275(29):21793-21796.
86. Matsumoto S., Shamloo M., Ishiki A., Wieloch T. Persistent phosphorylation of synaptic proteins following middle cerebral artery occlusion. *J.Cereb.Blood Flow Metab* (2002), 22(9):1107-1113.
87. Mayr M., Liem D., Zhang J., Li X., Avliyakov N.K., Yang J.I., Young G., Vondriska T.M., Ladroue C., Madhu B., Griffiths J.R., Gomes A., Xu Q., Ping P. Proteomic and metabolomic analysis of cardioprotection: Interplay between protein kinase C epsilon and delta in regulating glucose metabolism of murine hearts. *J.Mol.Cell Cardiol.* (2009), 46(2):268-277.

88. Mayr M., Metzler B., Chung Y.L., McGregor E., Mayr U., Troy H., Hu Y., Leitges M., Pachinger O., Griffiths J.R., Dunn M.J., Xu Q. Ischemic preconditioning exaggerates cardiac damage in PKC-delta null mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* (2004), 287(2):H946-H956.
89. Metzger F. i Kapfhammer J.P. Protein kinase C: its role in activity-dependent Purkinje cell dendritic development and plasticity. *Cerebellum*. (2003), 2(3):206-214.
90. Murphy E. i Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev.* (2008), 88(2):581-609.
91. Nakajima T. Signaling cascades in radiation-induced apoptosis: roles of protein kinase C in the apoptosis regulation. *Med.Sci.Monit.* (2006), 12(10):RA220-RA224.
92. Niewada M., Skowronska M., Ryglewicz D., Kaminski B., Czlonkowska A. Acute ischemic stroke care and outcome in centers participating in the Polish National Stroke Prevention and Treatment Registry. *Stroke* (2006), 37(7):1837-1843.
93. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* (1984), 308(5961):693-698.
94. Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* (1986), 233(4761):305-312.
95. Oderfeld-Nowak B., Orzylowska-Sliwinska O., Soltys Z., Zaremba M., Januszewski S., Janeczko K., Mossakowski M. Concomitant up-regulation of astroglial high and low affinity nerve growth factor receptors in the CA1 hippocampal area following global transient cerebral ischemia in rat. *Neuroscience* (2003), 120(1):31-40.
96. Ogbi M., Chew C.S., Pohl J., Stuchlik O., Ogbi S., Johnson J.A. Cytochrome c oxidase subunit IV as a marker of protein kinase Cepsilon function in neonatal cardiac myocytes: implications for cytochrome c oxidase activity. *Biochem.J.* (2004), 382(Pt 3):923-932.
97. Ogbi M. i Johnson J.A. Protein kinase Cepsilon interacts with cytochrome c oxidase subunit IV and enhances cytochrome c oxidase activity in neonatal cardiac myocyte preconditioning. *Biochem.J.* (2006), 393(Pt 1):191-199.
98. Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol.Lett.* (2004), 149(1-3):19-23.
99. Otani H. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in ischemic preconditioning. *Antioxid.Redox.Signal.* (2004), 6(2):449-469.

100. Ouyang Y.B., Tan Y., Comb M., Liu C.L., Martone M.E., Siesjo B.K., Hu B.R. Survival- and death-promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of Akt, release of cytochrome C and Activation of caspase-like proteases. *J.Cereb.Blood Flow Metab* (1999), 19(10):1126-1135.
101. Pahlmark K., Folbergrova J., Smith M.L., Siesjo B.K. Effects of dimethylthiourea on selective neuronal vulnerability in forebrain ischemia in rats. *Stroke* (1993), 24(5):731-736.
102. Parker P.J. i Murray-Rust J. PKC at a glance. *J.Cell Sci.* (2004), 117(Pt 2):131-132.
103. Pastorino J.G. i Hoek J.B. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J.Bioenerg.Biomembr.* (2008), 40(3):171-182.
104. Perez-Pinzon M.A., Dave K.R., Raval A.P. Role of reactive oxygen species and protein kinase C in ischemic tolerance in the brain. *Antioxid.Redox.Signal.* (2005), 7(9-10):1150-1157.
105. Perkins G.A., Wang L., Huang L.J., Humphries K., Yao V.J., Martone M., Deerinck T.J., Barraclough D.M., Violin J.D., Smith D., Newton A., Scott J.D., Taylor S.S., Ellisman M.H. PKA, PKC, and AKAP localization in and around the neuromuscular junction. *BMC.Neurosci.* (2001), 217-.
106. Pinton P., Leo S., Wieckowski M.R., Di Benedetto G., Rizzuto R. Long-term modulation of mitochondrial Ca²⁺ signals by protein kinase C isozymes. *J Cell Biol.* (2004), 165(2):223-232.
107. Pluta R., Lossinsky A.S., Mossakowski M.J., Faso L., Wisniewski H.M. Reassessment of a new model of complete cerebral ischemia in rats. Method of induction of clinical death, pathophysiology and cerebrovascular pathology. *Acta Neuropathol.(Berl)* (1991), 83(1):1-11.
108. Pulsinelli W.A. i Buchan A.M. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* (1988), 19(7):913-914.
109. Ramakers G.M., Pasinelli P., Hens J.J., Gispen W.H., De Graan P.N. Protein kinase C in synaptic plasticity: changes in the in situ phosphorylation state of identified pre- and postsynaptic substrates. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* (1997), 21(3):455-486.
110. Raval A.P., Dave K.R., Defazio R.A., Perez-Pinzon M.A. varepsilonPKC phosphorylates the mitochondrial K⁽⁺⁾(ATP) channel during induction of ischemic preconditioning in the rat hippocampus. *Brain Res.* (2007), 1184345-353.

111. Rosenthal R.E., Hamud F., Fiskum G., Varghese P.J., Sharpe S. Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J Cereb Blood Flow Metab* (1987), 7(6):752-758.
112. Saelens X., Festjens N., Vande W.L., van Gurp M., van Loo G., Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* (2004), 23(16):2861-2874.
113. Sahu S.K., Gummadi S.N., Manoj N., Aradhyam G.K. Phospholipid scramblases: an overview. *Arch.Biochem.Biophys.* (2007), 462(1):103-114.
114. Sarnowska A. Application of organotypic hippocampal culture for study of selective neuronal death. *Folia Neuropathol.* (2002), 40(2):101-106.
115. Sarnowska A., Beresewicz M., Zablocka B., Domanska-Janik K. Diazepam neuroprotection in excitotoxic and oxidative stress involves a mitochondrial mechanism additional to the GABAAR and hypothermic effects. *Neurochem Int.* (2009), 55(1-3):164-173.
116. Siesjo B.K., Elmer E., Janelidze S., Keep M., Kristian T., Ouyang Y.B., Uchino H. Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. *Acta Neurochir.Suppl (Wien.)* (1999), 737-13.
117. Skalska J., Bednarczyk P., Piwonska M., Kulawiak B., Wilczynski G., Dolowy K., Kudin A.P., Kunz W.S., Szewczyk A. Calcium Ions Regulate K Uptake into Brain Mitochondria: The Evidence for a Novel Potassium Channel. *Int.J.Mol.Sci.* (2009), 10(3):1104-1120.
118. Skalska J., Piwonska M., Wyroba E., Surmacz L., Wieczorek R., Koszela-Piotrowska I., Zielinska J., Bednarczyk P., Dolowy K., Wilczynski G.M., Szewczyk A., Kunz W.S. A novel potassium channel in skeletal muscle mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta* (2008), 1777(7-8):651-659.
119. Skibicka I., Niewada M., Skowronska M., Czlonkowska A., Czlonkowski A. Poststroke service in Poland: results of a 2-year prospective, observational study. *Int.J.Stroke* (2009), 4(5):318-319.
120. Starkov A.A., Chinopoulos C., Fiskum G. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium* (2004), 36(3-4):257-264.
121. Steinberg S.F. Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem J* (2004), 384(Pt 3):449-459.

122. Sulkowski G., Struzynska L., Lenkiewicz A., Rafalowska U. Changes of cytoskeletal proteins in ischaemic brain under cardiac arrest and reperfusion conditions. *Folia Neuropathol.* (2006), 44(2):133-139.
123. Szabo I., Bock J., Grassme H., Soddemann M., Wilker B., Lang F., Zoratti M., Gulbins E. Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (2008), 105(39):14861-14866.
124. Szabo I., Bock J., Jekle A., Soddemann M., Adams C., Lang F., Zoratti M., Gulbins E. A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* (2005), 280(13):12790-12798.
125. Szewczyk A. i Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol.Rev.* (2002), 54(1):101-127.
126. Traystman R.J. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR.J* (2003), 44(2):85-95.
127. Truscott K.N., Brandner K., Pfanner N. Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr.Biol.* (2003), 13(8):R326-R337.
128. Uchino H., Elmer E., Uchino K., Li P.A., He Q.P., Smith M.L., Siesjo B.K. Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res.* (1998), 812(1-2):216-226.
129. Uchino H., Minamikawa-Tachino R., Kristian T., Perkins G., Narazaki M., Siesjo B.K., Shibasaki F. Differential neuroprotection by cyclosporin A and FK506 following ischemia corresponds with differing abilities to inhibit calcineurin and the mitochondrial permeability transition. *Neurobiol.Dis.* (2002), 10(3):219-233.
130. Uecker M., Da Silva R., Grampp T., Pasch T., Schaub M.C., Zaugg M. Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* (2003), 99(1):138-147.
131. Ueda H. i Fujita R. Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain. *Biol.Pharm.Bull.* (2004), 27(7):950-955.
132. Ueda Y., Hirai S., Osada S., Suzuki A., Mizuno K., Ohno S. Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *Journal of Biological Chemistry* (1996), 271(38):23512-23519.
133. Van Q., Liu J., Lu B., Feingold K.R., Shi Y., Lee R.M., Hatch G.M. Phospholipid scramblase-3 regulates cardiolipin de novo biosynthesis and its resynthesis in growing HeLa cells. *Biochem.J.* (2007), 401(1):103-109.

134. Veh R.W., Lichtinghagen R., Sewing S., Wunder F., Grumbach I.M., Pongs O. Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain. *Eur.J.Neurosci.* (1995), 7(11):2189-2205.
135. Wang J., Bright R., Mochly-Rosen D., Giffard R.G. Cell-specific role for epsilon- and beta1-protein kinase C isozymes in protecting cortical neurons and astrocytes from ischemia-like injury. *Neuropharmacology* (2004), 47(1):136-145.
136. Wang Q.J. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol.Sci.* (2006), 27(6):317-323.
137. Wang W.L., Yeh S.F., Chang Y.I., Hsiao S.F., Lian W.N., Lin C.H., Huang C.Y., Lin W.J. PICK1, an anchoring protein that specifically targets protein kinase Calpha to mitochondria selectively upon serum stimulation in NIH 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* (2003), 278(39):37705-37712.
138. Wiedmer T., Zhou Q., Kwoh D.Y., Sims P.J. Identification of three new members of the phospholipid scramblase gene family. *Biochim.Biophys.Acta* (2000), 1467(1):244-253.
139. Wieloch T. i Kamme F. Cell signaling and ischemic neuronal death. (1998), (31):440-454.
140. Xu W., Liu Y., Wang S., McDonald T., Van Eyk J.E., Sidor A., O'Rourke B. Cytoprotective role of Ca²⁺- activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* (2002), 298(5595):1029-1033.
141. Yin X.H., Zhang Q.G., Miao B., Zhang G.Y. Neuroprotective effects of preconditioning ischaemia on ischaemic brain injury through inhibition of mixed-lineage kinase 3 via NMDA receptor-mediated Akt1 activation. *J Neurochem* (2005), 93(4):1021-1029.
142. Yu Q., Nguyen T., Ogbi M., Caldwell R.W., Johnson J.A. Differential loss of cytochrome-c oxidase subunits in ischemia-reperfusion injury: exacerbation of COI subunit loss by PKC-epsilon inhibition. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* (2008), 294(6):H2637-H2645.
143. Zablocka B. Mitochondria-początek i koniec uszkodzenia ischemicznego mózgu. *Nauka* (2003), 3185-189.
144. Zablocka B., Dłużniewska J., Zajac H., Domanska-Janik K. Opposite reaction of ERK and JNK in ischemia vulnerable and resistant regions of hippocampus: involvement of mitochondria. *Brain Res.Mol.Brain Res.* (2003), 110(2):245-252.

145. Zablocka B., Gajkowska B., Czechmanska T., Domanska-Janik K. Isoforms of protein kinase C in postsynaptic densities after cerebral ischemia. *Brain Res.* (2001), 889(1-2):105-111.

