

TERESA ZALEWSKA



25 195

H3072

**KINAZY BIAŁKOWE (CaMKII, PKC) I PROTEAZY (KALPAINY)
WŁĄCZONE W ODBIÓR SYGNAŁU WAPNIOWEGO
W NIEDOKRWIENIU MÓZGU**

Rozprawa na stopień doktora habilitowanego

**PRACOWNIA NEUROPATOLOGII MOLEKULARNEJ, ZAKŁAD NEUROCHEMII
INSTYTUT CENTRUM MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
POLSKA AKADEMIA NAUK**

WARSZAWA 1998

*Pani Doc. dr hab. Krystynie Domańskiej-Janik
serdecznie dziękuję za okazaną życzliwość i wsparcie,
za cenne rady i wskazówki oraz krytyczne uwagi
udzielane w trakcie pisania niniejszej rozprawy.*

*Dziękuję Paniom Teresie Czechmańskiej i Halinie Zajac
za pełną zaangażowania pomoc techniczną.*

Przedstawione w rozprawie wyniki badań opublikowano w następujących pozycjach

PRACE ORYGINALNE

1. **Zalewska T.**, Domańska-Janik K. (1990) Functional role of calcium-activated neutral proteinase (CANP) in the central nervous system. Scientific Reports of Jagiellonian University, 19, 105-115.
2. Domańska-Janik K., **Zalewska T.** (1992) Effect of brain ischemia on protein kinase C. J. Neurochem. 58, 1432-1439.
3. **Zalewska T.**, Zabłocka B., Domańska-Janik K. (1996) Changes of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase-II after transient ischemia in gerbil hippocampus. Acta Neurobiol. Exp. 56, 41-48.
4. **Zalewska T.**, Białynicka-Birula K., Domańska-Janik K. (1996) Autophosphorylation as a possible mechanism of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibition during ischemia. Neurochem. Int. 28, 175-181.
5. **Zalewska T.**, Domańska-Janik K. (1996) Brain ischaemia transiently activates Ca^{2+} /calmodulin-independent protein kinase II. NeuroReport 7, 637-641.
6. **Zalewska T.**, Zabłocka B., Saido T.C., Domańska-Janik K. (1997) On the mechanism of calpain activation under ischemia. Proceedings of the XI ESN Meeting, Amsterdam. Neurochemistry, ed. by Telken and Korf, Plenum Press, New York, pp. 407-414.
7. Domańska-Janik K., **Zalewska T.** (1997) Transient increase of calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaM KII) in its autonomous state under brain ischemia. Proceedings of the XI ESN Meeting, Amsterdam. Neurochemistry, ed. by Telken and Korf, Plenum Press, New York, pp. 369-373.
8. **Zalewska T.**, Zabłocka B., Saido T.C., Zając H., Domańska-Janik K. (1998) Dual response of calpain to post-decapitative ischemia in rat brain. Mol. Chem. Neuropathol. 33.

Współautorom tych publikacji składam w tym miejscu serdeczne podziękowania.

SPIS TREŚCI

WSTĘP	1
Wprowadzenie	1
CEL PRACY	5
KINAZA BIAŁKOWA II (CaMKII)	7
WPROWADZENIE	7
Charakterystyka ogólna.....	7
Struktura molekularna.....	8
Autoregulacyjne własności CaMKII.....	9
Potencjalna rola CaMKII w modulacji procesów komórkowych w ośrodkowym układzie nerwowym.....	10
MATERIAŁ I METODY	13
1. Materiał doświadczalny.....	13
2. Modele niedokrwienia.....	13
2.1. Niedokrwienie wywołane zatrzymaniem akcji serca (cardiac arrest).....	13
2.2. Niedokrwienie odwracalne	13
2.3. Farmakologiczne modyfikacje reakcji mózgu na ischemię.....	14
3. Przygotowanie tkanki do badania aktywności i lokalizacji CaMKII.	14
4. Oznaczenie aktywności CaMKII.....	15
5. Autofosforylacja CaMKII.....	15
6. Analiza immunochemiczna.....	16
7. Immunoprecypitacja.....	16
8. Inne procedury.....	16
8.1. Stężenie białka.....	16
8.2. Analiza statystyczna.....	16
WYNIKI	17
1. Wpływ niedokrwienia wywołanego zatrzymaniem akcji serca na zachowanie CaMKII w mózgu szczura.....	17

1.1. Aktywności enzymatyczne CaMKII.....	17
1.2. Lokalizacja subkomórkowa i poziom białka podjednostki α CaMKII (50kDa).w mózgu szczura.....	19
1.3. Autofosforylacja CaMKII w homogenatach mózgu <i>in vitro</i> i jej wpływ na lokalizację subkomórkową enzymu.....	21
1.4. Autofosforylacja immunoprecypitowanej CaMKII <i>ex vivo</i>	23
2. Wpływ niedokrwienia odwracalnego i reperfuzji na zachowanie CaMKII w korze mózgu chomika mongolskiego.....	25
2.1. Dynamika zmian aktywności CaMKII.....	25
2.2. Lokalizacja subkomórkowa CaMKII.....	27
2.3. Wpływ antagonisty receptora/kanalu NMDA - MK801 na aktywność CaMKII.....	30
 KINAZA BIAŁKOWA ZALEŻNA OD WAPNIA I FOSFOLIPIDÓW (KINAZA BIAŁKOWA C, PKC).....	36
WPROWADZENIE.....	36
Charakterystyka ogólna.....	36
Struktura molekularna.....	36
Regulacja aktywności.....	38
Kinaza białkowa C w ośrodkowym układzie nerwowym.....	40
 MATERIAŁ I METODY.....	42
1. Materiał doświadczalny.....	42
2. Modele niedokrwienia.....	42
2.1. Model ischemii podekapitacyjnej u szczurów.....	42
2.2. Niedokrwienie odwracalne u chomika mongolskiego.....	42
3. Przygotowanie tkanki do oznaczenia aktywności cPKC.....	42
4. Oznaczanie aktywności cPKC.....	43
5. Wiązanie [3 H]PDBu do błon.....	43
6. Analiza immunochemiczna.....	43
7. Inne procedury.....	44
7.1. Oznaczanie białka.....	44
7.2. Analiza statystyczna.....	44

WYNIKI	45
1. Wpływ nieodwracalnego niedokrwienia na aktywność cPKC w subkomórkowych frakcjach mózgu szczura.....	45
1.1. Aktywność enzymatyczna i poziom białka cPKC.....	45
1.2. Oznaczenie ilości cPKC przez wiązanie estru forbolu (PDBu).....	48
2. Wpływ odwracalnego niedokrwienia i reperfuzji na aktywność i subkomórkową lokalizację cPKC w mózgu chomika mongolskiego.....	49
2.1. Aktywność cPKC.....	49
2.2. Lokalizacja subkomórkowa białka cPKC określona metodą immunochemiczną.....	51
 PROTEAZY CYSTEINOWE ZALEŻNE OD WAPNIA - KALPAINY.....	 57
 WPROWADZENIE.....	 57
Charakterystyka ogólna.....	57
Struktura molekularna.....	58
Mechanizmy regulacji kalpain.....	59
Kalpstatyna.....	60
Kalpainy w o.u.n.....	61
 MATERIAŁ I METODY.....	 63
1. Materiał doświadczalny.....	63
2. Modele niedokrwienia.....	63
3. Przygotowanie tkanki do oznaczania aktywności kalpain.....	63
4. Izolacja kalpain i kalpastatyny.....	63
5. Oznaczenie aktywności kalpain.....	64
6. Oznaczenie aktywności kalpastatyny.....	64
7. Reakcja immunochemiczna.....	65
8. Inne procedury.....	65

WYNIKI.....	66
1. Wpływ nieodwracalnego niedokrwienia na układ zależnej od wapnia proteolizy (kalpaina-kalpastatyna) w mózgu szczura.....	66
1.1. Aktywność enzymatyczna i lokalizacja komórkowa μ i m-kalpainy.....	66
1.2. Poziom natywnej (pre-autolitycznej) i aktywnej (post-autolitycznej) formy μ -kalpainy.....	69
1.3. Aktywność endogennego inhibitora kalpain - kalpastatyny.....	69
1.4. Proteoliza specyficznego substratu kalpain - fodryny.....	74
2. Wpływ niedokrwienia odwracalnego i reperfuzji na aktywność i lokalizację subkomórkową kalpain w korze mózgu chomika mongolskiego.....	76
2.1. Aktywność m kalpainy.....	76
2.2. Ilość i lokalizacja subkomórkowa kalpain w mózgu chomika mongolskiego.....	77
2.3. Określenie poziomu białka formy aktywnej μ -kalpainy (76 kDa) w hipokampie mózgu chomika mongolskiego.....	81
2.4. Proteoliza specyficznych substratów kalpain w hipokampie chomika mongolskiego.....	83
2.4.1. Proteoliza fodryny.....	84
2.4.2. Proteoliza klasycznych izoform kinazy białkowej C (cPKC).....	84
DYSKUSJA.....	91
WNIOSKI.....	104
STRESZCZENIE.....	105
PIŚMIENNICTWO.....	108

INDEKS SKRÓTÓW

AK 275	- inhibitor kalpain z grupy ketoamidów (nazwa zastrzeżona)
AK 295	- inhibitor kalpain z grupy ketoamidów (nazwa zastrzeżona)
AMPA	- kwas alfa-amino-3-hydroksy-5-metylizoksazol-propionowy
AP1	- białko aktywatorowe (ang. activator protein 1)
ATP	- adenozyno trifosforan
ATPaza	- adenozynotrifosfataza
CaM	- kalmodulina
CaM-KII	- wielofunkcyjna, zależna od kalmoduliny kinaza II
CX216	- inhibitor kalpain, α -keto ester dwupeptydu (nazwa zastrzeżona)
DAG	- 1,2 diacyloglicerol (ang. diacylglycerol)
DTT	- dithiothreitol
EDTA	- kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. ethylenediaminetetraacetate)
EGTA	- etylenoglikolo-bis-(β -aminoetyloetero)- <i>N,N,N',N'</i> - tetraoctan (ang. ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetate)
FAK	- (ang. Focal Adhesion Kinase)
FBDP	- produkty proteolitycznego rozpadu fodryny (ang. fodrin breakdown products)
GAP-43	- inaczej B-50 lub neuromodulina (ang. grow associated protein)
HA 1077	- inhibitor kinaz zależnych od wapnia (nazwa zastrzeżona)
H7	- inhibitor kinaz, dwuchlorowodorek 1-(5-izoquinolino-sulfonylo)- 2 metylo piperazyny [ang. 1-(5-izoquinolinesulfonyl)-2-metylpiperazine dihydrochloride]
HEPES	- 4-(2 hydroksyetylo)-1-piperazina-etanosulfonowy kwas (ang. 4-(2 hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid)
Km	- stała Michaelisa
IP3	- 1,4,5-trisfosforan inozytolu (ang. inositol 1,4,5-trisphosphate)
LTP	- długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. Long Term Potentiation)

MAP-2	- białko zasocjowane z mikrotubulami (ang. microtubul associated protein)
MAP kinaza	- (ang. mitogen activated protein kinase)
MARCKS	- białka substratowe PKC (ang. myristoylated alanine-rich C kinase substrate)
MCE	- 2-merkaptoetanol (mercaptoethanol)
MK 801	- dizocylopina , (5 metylo-, 10,22 dwuhydro 5H-dibenzo (a,d) cyklohepten-5,10, iminomaleinian
mRNA	- informacyjny kwas rybonukleinowy (ang. messenger ribonucleic acid)
NMDA	- kwas N-metylo-D-asparaginowy (ang. N-methyl-D-aspartic acid)
PAGE	- elektroforeza na żelu poliakrylamidowym (polyacrylamide gel electrophoresis)
PDBu	- dimaślan forbolu , (ang. β phorbol 12,13 dibutyrate)
PEST	- odcinek łańcucha polipeptydowego bogaty w prolinę-kwas glutaminowy/kwas asparaginowy-serynę-treoninę
PIP3	- fosfatydyloinozytolo-1,4,5-trisfosforan (phosphatidylinositol tris phosphate 1,4,5)
PKC	- kinaza białkowa C (ang. protein kinase C) a PKC - grupa atypowych PKC c PKC - grupa klasycznych (konwencjonalnych) PKC n PKC - grupa nowych PKC
PKM	- kinaza białkowa M, katalityczny fragment PKC
PLC	- fosfolipaza C
PMSF	- fenylmetylsulfonylu fluorek (ang. phenylmethylsulfonyl fluoride)
PS	- fosfatydyloseryna (ang. phosphatidylserine)
PSD	- gęstości postsynaptyczne (ang. postsynaptic density)
RACK	- receptor dla zaktywowanej PKC (ang. receptor activated C kinase)
SDS	- dodecylosiarczan sodu (sodium dodecyl sulphate)
TRIS	- tris(hydroksymetylo)aminometan

WSTĘP

Wprowadzenie

Niedokrwienie mózgu jest niewątpliwie jednym z najcięższych i najczęściej występujących czynników uszkadzających ośrodkowy układ nerwowy. Na podstawie danych doświadczalnych i spostrzeżeń klinicznych przyjmuje się, że zatrzymanie krążenia krwi na okres dłuższy od 4-5 minut prowadzi do szybkiego narastania zaburzeń czynnościowych układu nerwowego, a dalej - do utraty integralności strukturalnej mózgu.

Do grupy neuronów najbardziej podatnych na degenerację należą komórki hipokampa (głównie rejony CA1 i CA3 oraz wzniesienie zakrętu zębatego), II i VI warstwa kory mózgowej, komórki prążkowiec oraz komórki Purkiniego w mózdzku (Kirino, Sano, 1984; Collins i wsp., 1989). W tych wrażliwych na ischemię strukturach uszkodzenie neuropatologiczne zaobserwować można już w ciągu kilku minut po zakończeniu epizodu ischemicznego, jeśli jest on dostatecznie ciężki i wystarczająco przedłużony, aby spowodować nieodwracalne wyczerpanie rezerw energetycznych.

Istnieje pełna zgodność, że bezpośrednią przyczyną ostrej fazy uszkodzenia neuronalnego jest głęboki niedobór energetyczny, prowadzący do zaburzenia homeostazy komórkowej (Siesjö, 1992; 1993). Całkowita ischemia mózgu wiąże się z gwałtownym przejściem metabolizmu od stanu równowagi, w którym podstawowe substraty (glukoza i tlen) są dostarczane w sposób ciągły a produkty ich przemian usuwane, do stanu układu zamkniętego, w którym tkanka może uzyskać energię wyłącznie kosztem endogennych zasobów związków wysokoenergetycznych (głównie fosfokreatyny i ATP) oraz z beztlenowych przemian komórkowych zapasów glukozy i glikogenu. Szczupłość tych zapasów, niska wydajność energetyczna beztlenowych przemian glukozy oraz duża szybkość zużywania związków wysokoenergetycznych przez mózg, prowadzi do szybkiego spadku produkcji energii. Konsekwencją niedoboru energetycznego jest cały szereg efektów wtórnych (takich jak depolaryzacja błon,

uwolnienie neuroprzekazników z zakończeń presynaptycznych, w tym aminokwasów pobudzających, zaburzenie homeostazy jonowej, obniżenie wewnątrzkomórkowego pH, zahamowanie zależnych od energii szlaków syntezy związków makromolekularnych), z których każdy może przyczynić się do ograniczenia przeżywalności komórek nerwowych.

Niedokrwienie mózgu poza bezpośrednią, związaną z głębokim niedoborem energetycznym martwicą tkanki, wpisaną w ostrą fazę uszkodzenia poischemicznego, może inicjować powolny proces patologiczny, prowadzący do nieodwracalnych zmian i tzw. opóźnionej śmierci komórek nerwowych nawet w ciągu kilku dni po przywróceniu krążenia (Kirino, 1982; Pulsinelli i wsp., 1982). W przeciwieństwie do uszkodzenia ostrego, nie wykazującego specyficzności w stosunku do struktur czy specjalnych populacji komórkowych, fenomen opóźnionej śmierci komórek po krótkich epizodach ischemicznych (trwających 5-15 minut) charakteryzuje się wybiórczością do neuronów zlokalizowanych w pewnych określonych strukturach (np. rejon CA1 hipokampa) (Kirino 1982; Kirino, Sano 1984; Pulsinelli 1985). Pierwsze zmiany morfologiczne są widoczne już w czasie 6-24 godzin po przywróceniu krążenia i w zależności od czasu trwania epizodu ischemicznego zmiany degeneracyjne mogą narastać nawet w ciągu kilku dni.

Wydaje się, że mechanizm powstawania tych opóźnionych, selektywnych uszkodzeń poniedokrwiennych, jest wysoce specyficzny i znacznie odbiegający od tego, co obserwuje się w ostrej fazie patologii niedokrwiennej. Zagadnienie jest tym bardziej intrygujące, że w okresie dojrzewania późnych zmian poischemicznych przepływ krwi przez mózg nie odbiega od wartości kontrolnych (Suzuki i wsp., 1983). Nie obserwuje się także większych zakłóceń metabolizmu energetycznego, homeostazy jonów sodu, potasu jak i zawartości wody (Pulsinelli, Duffy, 1983; Arai i wsp., 1986). Późne uszkodzenia neuronów powstają prawdopodobnie w wyniku rozwoju określonej sekwencji wtórnych zaburzeń biochemicznych i molekularnych, indukowanych jedynie stresem niedokrwinnym.

Istnieją liczne przesłanki wskazujące, że patologia niedokrwienia jest związana lub nawet zapoczątkowana wejściem wapnia do komórek w następstwie nadmiernego uwalniania neuroprzekazników pobudzających z zakończeń nerwowych i aktywacji ich receptorów (Benveniste i wsp., 1984; Siesjö, Bengtsson, 1989; Choi, 1995). Uaktywnienie kanałów wapniowych zarówno tych, związanych z pobudzeniem receptorów glutamatergicznych, z dominującą rolą kanału związanego z receptorem NMDA (Choi, 1988, 1994) a następnie AMPA, jak i kanałów zależnych od potencjału a także uwolnienie wapnia wewnątrzkomórkowego (Manev i wsp., 1990; Mayer, Miller, 1990), powoduje wzrost stężenia tego jonu w cytosolu a następnie aktywację licznych wapniowo-zależnych układów enzymatycznych (Siesjö, Bengtsson, 1989; Choi 1992; Schoepp, Sacca, 1994).

Efekty funkcjonalne, wynikające z pobudzenia receptorów błonowych w trakcie niedokrwienia, zależą w dużej mierze od aktywności wapniowo-zależnych kinaz i proteaz. Odpowiedzi tych enzymów na stres ischemiczny mogą reprezentować początkowy etap w procesie transdukcji sygnału wapniowego. Na podstawie zebranych dowodów wiadomo, że stymulacji kinaz i proteaz towarzyszą zmiany w ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Kompartmentalizacja kinaz i proteaz a następnie powiązanie enzymów ze strategicznymi substratami komórkowymi może stanowić ważny czynnik dla regulacji procesu przekazywania w neuronach. Tak więc narastająca dysfunkcja wewnątrzkomórkowych efektorów sygnału wapniowego, jakimi są oba układy zależnej od Ca^{2+} fosforylacji i proteolizy, wydaje się być jednym z pierwszych ogniw włączonych w tok zdarzeń, prowadzących do opóźnionej i wybiórczej neurodegeneracji we wrażliwych obszarach mózgu.

W świetle aktualnych badań wydaje się, że istnieją dwa podstawowe mechanizmy ischemicznego uszkodzenia neuronów: nekroza i apoptoza (Bredesen, 1995; Choi 1996). Pierwszy z nich jest powodowany silnymi bodźcami uszkadzającymi, które zaburzają metabolizm komórki i powodują jej lizę w wyniku naruszenia integralności błon plazmatycznych. Charakterystyczne elementy obrazu morfologicznego nekrozy obejmują również obrzęk organelli wewnątrzkomórkowych i ich dezintegrację.

Apoptoza natomiast jest wywołana bodźcami o mniejszym natężeniu, które wyzwalają w komórkach strukturalnie nie uszkodzonych kaskadę aktywnych procesów, prowadzących do śmierci. W procesie tym występują często typowe zmiany morfologiczne, a mianowicie kondensacja i fragmentacja chromatyny, kurczenie się komórki, przy niezmienionej strukturze organelli cytoplazmatycznych a także, w końcowej fazie, fragmentacja komórki z utworzeniem tak zwanych ciałek apoptotycznych.

CEL PRACY

Przedmiotem mojego zainteresowania było wyjaśnienie roli dwóch zależnych od wapnia kinaz serynowo-treoninowych: zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny kinazy białkowej II (CaMKII) i zależnej od Ca^{2+} i fosfolipidów kinazy białkowej C (cPKC) oraz proteaz cysteinowych - kalpain, w przebiegu poischemicznego uszkodzenia neuronalnego.

Obok określenia zmian aktywności katalitycznej, oznaczono lokalizację wewnątrzkomórkową badanych enzymów celem sprawdzenia, czy ulega ona zmianie pod wpływem bodźca niedokrwiennego. Zmiany aktywności kinaz i proteaz w przedłużonym procesie poischemicznej indukcji śmierci komórki porównano z tymi zmianami, które towarzyszą szybkim procesom, prowadzącym do nekrozy.

W badaniach nad rolą wapniowo-zależnych kinaz i proteaz w uszkodzeniu ischemicznym zastosowano dwa ogólnie akceptowane modele ischemiczne (Siesjö, 1978; Domańska-Janik i wsp., 1985), które odpowiadały dwóm opisanym typom uszkodzenia mózgu. Jednym z modeli była ischemia podekapitacyjna lub ischemia wywołana zatrzymaniem akcji serca (cardiac arrest), prowadzące do głębokiego obniżenia rezerw energetycznych i w konsekwencji do nieodwracalnych zmian komórek nerwowych.

Model drugi stanowiła przemijająca i niekompletna ischemia, wywołana podwiązaniem dwustronnym tętnic szyjnych wspólnych, która indukuje postępujące wybiórcze uszkodzenie neuronalne tylko w określonych wrażliwych okolicach, głównie w hipokampie (Kirino, Sano, 1984). W tym modelu ischemii neurodegeneracja wydaje się wykazywać raczej cechy procesu apoptotycznego (Kihara i wsp., 1994; MacManus i wsp., 1994; Nitatori i wsp., 1995; Honkaniemi i wsp., 1996), jakkolwiek jest bardziej prawdopodobne, że oba mechanizmy: nekrotyczny i apoptotyczny występują równocześnie, choć w różnym nasileniu, w obu modelach ischemicznych (Ankarcrona i wsp. 1995; Bonfoco i wsp. 1995; Van Lookeren Campagne i wsp. 1995; Staton, Bristow

1997). Ewentualne różnice odpowiedzi badanych enzymów (kinaz i proteaz) na niedokrwienie o różnym stopniu nasilenia mogłyby przyczynić się w pewnej mierze do wyjaśnienia mechanizmów śmierci neuronalnej (nekroza vs apoptoza)

Podjęte badania stanowią jedynie fragment wywołanej niedokrwieniem kaskady zdarzeń, tym niemniej jego poznanie wydaje się być ważnym etapem na drodze wyjaśniania zmian molekularnych, leżących u podłoża procesu patologicznego.

KINAZA BIAŁKOWA II (CaMKII)

WPROWADZENIE

Charakterystyka ogólna

Kinaza białkowa II (CaMKII; fosfotransferaza ATP:białko; EC. 2.7.1.37) należy do rodziny kinaz stymulowanych przez wapń i kalmodulinę. W odróżnieniu od innych enzymów tej grupy, wykazujących powinowactwo do jednego lub co najwyżej dwóch substratów, kinaza II posiada zdolność fosforylowania wielu białek. Około 30 substratów tej kinazy zidentyfikowano na podstawie badań *in vitro*. Są to między innymi białka włączone w syntezę i uwalnianie neuroprzekazników (Valtorta i wsp.,1992; Greengard i wsp.,1993), w metabolizm węglowodanów (Payne i wsp.,1983), formowanie cytoszkieletu (Yamamoto i wsp.,1983; Goldenring i wsp.,1984; Steiner i wsp.,1990) czy ekspresję genów (Colbran, Soderling, 1990; Hanson, Schulman, 1992a; Kelly, 1992; Rostas, Dunkley, 1992; Braun, Schulman, 1995).

Kinaza białkowa II jest enzymem występującym we wszystkich badanych tkankach ssaków (Schulman, Greengard,1978; Tobimatsu, Fujisawa,1989). Biorąc pod uwagę zarówno wielofunkcyjność jak i powszechność lokalizacji, sugeruje się udział kinazy II w regulacji wielu procesów fizjologicznych takich np. jak kurczliwość mięśni, sekrecja, transmisja synaptyczna i związane z nią procesy pamięci czy ekspresja genów. Jednak niewiele wiadomo na temat jej funkcji *in vivo*. Dokładne określenie roli funkcjonalnej CaMKII stanie się prawdopodobnie możliwe dzięki badaniom prowadzonym na zwierzętach transgenicznym.

W ciągu ostatnich lat uwaga badaczy skierowana była głównie na poznanie biochemicznych właściwości CaMKII. Szczególne zainteresowanie wzbudziły opisane w dalszej części prezentowanej pracy fascynujące mechanizmy regulacyjne wiążące się z

indukcją formy autonomicznej, niezależnej od jonu wapniowego, jak i konsekwencje dla regulacji funkcji komórkowych przez tę kinazę.

Struktura molekularna

CaM kinaza jest dużym enzymem złożonym z 6-12 podjednostek o ciężarze cząsteczkowym 54-60 kDa, z których każda zdolna jest do wiązania kalmoduliny i autofosforylacji (Hanson, Schulman 1992,1992a; Bronstein i wsp.,1993; Dosemeci, Choi,1997). Z poznanych dotychczas czterech podjednostek CaMKII (α , β , γ , δ), stanowiących produkty odrębnych genów, jedynie podjednostki α i β są izoformami neuronalnymi (Kanaseki i wsp.,1991), podczas gdy dwie pozostałe znaleźć można we wszystkich badanych narządach, nie wyłączając mózgu (Tobimatsu, Fujisawa,1989).

Struktura molekularna CaMKII wykazuje znaczne podobieństwo do innych kinaz serynowo-treoninowych. Poszczególne domeny enzymu są ułożone w sposób typowy od N do C-końca wzdłuż łańcucha polipeptydowego, tworzącego monomer enzymu. Fragment łańcucha polipeptydowego, pełniący funkcję katalityczną (odpowiedzialny za przeniesienie grupy fosforanowej), usytuowany jest na N-końcu. Po nim następuje część regulatorowa z sekwencją aminokwasów o charakterze autoinhibycyjnym, blokującą miejsce wiązania kalmoduliny. Końcowy odcinek polipeptydu odpowiedzialny jest natomiast za asocjację z innymi monomerami i utworzenie agregatów (domena asocjacyjna).

Katalityczne fragmenty znanych izoform CaMKII wykazują około 90% homologii. Podstawową różnicę stanowią specyficzne dla poszczególnych izoform odcinki łańcucha pomiędzy domeną katalityczną/regulatorową a domeną asocjacyjną. Jakkolwiek funkcja tego zmiennego regionu nie jest do końca poznana wydaje się, że ten właśnie fragment determinować może funkcjonalną charakterystykę poszczególnych izoform CaMKII, wrażliwość na kompleks Ca^{2+} /kalmodulina jak i skład holoenzymu a głównie asocjację ze specyficznymi strukturami subkomórkowymi.

Autoregulacyjne właściwości CaMKII

Oczyszczona CaMKII wykazuje całkowitą zależność od wapnia i kalmoduliny. Przyłączenie się kompleksu wapń/kalmodulina do cząsteczki enzymu inicjuje zmianę konformacyjną białka, prowadzącą do aktywacji. Kalmodulina powoduje odblokowanie centrum aktywnego enzymu, umożliwiając przyłączenie zarówno ATP jak i peptydowego substratu (Smith i wsp., 1992; Cruzalegui i wsp., 1992).

Jedynym znanym mechanizmem regulacji aktywności enzymu po przyłączeniu wapnia i kalmoduliny jest dwustopniowa intramolekularna fosforylacja. Zaktywowana kinaza autofosforyluje resztę aminokwasu treoniny w pozycjach: 286 podjednostki α i 287 podjednostki β na domenie inhibicyjnej łańcucha, co prowadzi do powstania niezależnej od aktywatorów formy autonomicznej (Miller, Kennedy, 1986; Payne i wsp., 1988; Thiel i wsp., 1988). Jakkolwiek sama fosforylacja treoniny w tym ściśle określonym położeniu nie jest niezbędna dla aktywności kinazy, jednym z ważnych efektów tego procesu jest prawie tysiąckrotne zwiększenie powinowactwa kinazy do kalmoduliny (zmiana K_m : z 45nM do 60pM) przez obniżenie stopnia dysocjacji kompleksu enzym-kalmodulina (Meyer i wsp., 1992). Wzrost powinowactwa umożliwia współzawodniczenie CaMKII z innymi wiążącymi kalmodulinę białkami w przypadku ograniczonych zasobów tego aktywatora.

Ważną konsekwencją wprowadzenia ładunku ujemnego w postaci grupy fosforanowej jest również to, że domena inhibicyjna nie jest w stanie zablokować katalitycznej aktywności enzymu nawet po oddysocjowaniu kalmoduliny. W tych warunkach autofosforylowana podjednostka, stanowiąca tzw. autonomiczną formę enzymu, pozostaje częściowo aktywna (20-80% maksymalnej stymulowanej przez wapń aktywności) nawet przy braku wapnia (Miller, Kennedy, 1986; Schulman i wsp., 1995). Taka kowalencyjna modyfikacja białka prowadzi do wzmocnienia i przedłużenia odpowiedzi na pierwotny sygnał wapniowy.

Kolejne, niezależne od wapnia fosforylacje aminokwasów polipeptydowego łańcucha autonomicznej formy CaMKII (seryna w pozycji 314, treonina w pozycjach 305/306) blokują wiązanie kompleksu wapń/kalmodulina i prowadzą do inhibicji enzymu. Tak więc forma wysoko ufosforylowana utrzymuje kinazę w stanie nieaktywnym, nawet przy wysokim poziomie wapnia. Do funkcjonalnego zahamowania aktywności kinazy po pobudzeniu dochodzi natomiast przez defosforylację treoniny w pozycji 286 łańcucha polipeptydowego (Patton, 1990; Hanson, Schulman, 1992).

Potencjalna rola CaMKII w modulacji procesów komórkowych w ośrodkowym układzie nerwowym

Specyficzne dla mózgu izoformy α i β CaMKII stanowią 0.1-2% wszystkich białek w zależności od badanej okolicy (Erondy, Kennedy, 1985). Wysokie stężenie enzymu stwierdzono w hipokampie (1-2% wszystkich białek tej struktury), korze mózgowej, prążkowie i jądrze migdałowatym (Onodera i wsp., 1990; Benson i wsp., 1992; Hanson, Schulman, 1992a; Goto i wsp., 1993).

Kinaza badanych struktur mózgu różni się stosunkiem podjednostek α do β (np. w półkulach mózgu wynosi on 3:1, a w mózdzku 1:3) (Benson i wsp., 1992a; Bronstein i wsp., 1993), co może wiązać się z różnicami ich regulacji i/lub funkcji w poszczególnych rejonach ośrodkowego układu nerwowego (Quimet i wsp., 1984; Fukunaga i wsp., 1988). Wysokie stężenie CaMKII w mózgu sugeruje, że enzym jest elementem strukturalnym, pełniącym równocześnie funkcję katalityczną.

CaM kinaza i jej substraty zlokalizowane są w różnych przedziałach komórkowych w tkance nerwowej (Colbran, Soderling, 1990; Hanson, Schulman, 1992; Kelly, 1992; Rostas, Dunkley, 1992). Najbardziej charakterystycznym miejscem lokalizacji (głównie podjednostki α) mają być zagęszczenia postsynaptyczne (PSD) neuronów, gdzie stężenie enzymu wynosi 30-40% wszystkich białek tej struktury (Kennedy i wsp., 1983; Goldenring i wsp., 1984a; Kelly i wsp., 1984; Wu i wsp., 1992; Dosemeci, Choi, 1997). Niektóre z ostatnio publikowanych prac wskazują jednak, że

wzbogacenie PSD w CaMKII może być artefaktem, wynikającym z niewłaściwego przygotowania materiału do badań (Suzuki i wsp., 1993 oraz niepublikowane badania własne).

Obecność kinazy białkowej II wykazano także w zakończeniach presynaptycznych jak i w jądrze komórkowym (Sahyoun i wsp., 1984; 1984a; Gorelick i wsp., 1988).

Według niektórych grup badaczy CaMKII zlokalizowana jest wyłącznie w zakończeniach glutamatergicznych kory mózgu i wzgórza. Zarówno mRNA, jak i białko izoform α i β , są obecne w obrębie tych samych populacji neuronów pobudzających (Jones i wsp., 1994; Liu, Jones, 1996). Poza neuronami obecność znikomych ilości CaMKII wykazano w astrocytach (Fukunaga i wsp., 1988).

Wyniki licznych badań wskazują na bezpośredni związek kinazy z transdukcją sygnału wapniowego, wytwarzanego w trakcie pobudzenia w dendrytach komórek nerwowych. Wielu badaczy podkreśla niezbędny udział aktywności fosforylacyjnej CaMKII w regulacji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) (Lisman, 1989; Malinow i wsp., 1989; Malenka i wsp., 1989; Malenka, 1994; Mayford i wsp., 1995). Zaktywowana przez kompleks wapń/calmodulina kinaza może spowodować nie tylko krótkotrwałe modulacje funkcji neuronalnych na drodze fosforylacji kluczowych dla komórki białek włączonych w neurotransmisję (Llinas i wsp. 1985, 1991; Tan i wsp., 1994), ale także doprowadzić do trwałych zmian funkcjonalnych, zmieniając odczyt (transkrypcję) kodu genetycznego (Dash i wsp., 1991; Kapiloff i wsp., 1991; Sheng i wsp., 1991; Bading i wsp., 1993).

Jedną z ważniejszych funkcji kinazy zlokalizowanej w przedziale presynaptycznym jest regulacja uwalniania neuroprzekazników poprzez fosforylację synapsyny - głównego białka pęcherzyków synaptycznych (Valtorta i wsp., 1992; Greengard i wsp., 1993). Innym substratem CaMKII, znajdującym się w części presynaptycznej neuronu, jest hydroksylaza tyrozynowa - enzym zaangażowany w syntezę monoamin (Yamauchi i wsp., 1981; Atkinson i wsp., 1987). Na zakończenie nie sposób pominąć wpływu CaM kinazy na dynamiczne zmiany struktury cytoszkieletu

neuronalnego w drodze fosforylacji jego komponent takich jak tubulina, MAP-2 i tau, ułatwiających bądź utrudniających asocjacje z innymi elementami (Yamamoto i wsp., 1983; Goldenring i wsp., 1984; Vallano i wsp., 1986; Steiner i wsp., 1990).

Zależna od wapnia i kalmoduliny kinaza jest jednym z głównych efektorów sygnału wapniowego. Należy zatem oczekiwać, że zaburzenie wewnątrzkomórkowej homeostazy wapnia będzie istotnym elementem modulacji aktywności, co w konsekwencji może powodować nieprawidłowości w transdukcji sygnałów.

Dotychczasowe prace eksperymentalne, prowadzone w układach *in vivo* jak i *in vitro*, dostarczyły dowodów, że CaM kinaza może pełnić rolę w neuronalnym uszkodzeniu poischemicznym (Taft i wsp., 1988; Churn i wsp., 1990; 1990a; Aronowski i wsp., 1992; Hanson i wsp. 1994; Shackelford i wsp. 1995), jakkolwiek funkcja tego enzymu nie została wyjaśniona jednoznacznie. Obserwacje Chapmana i wsp. (1995) wskazują na CaM kinazę jako czynnik ograniczający uwalnianie ekscytotoksycznego glutaminianu w warunkach pobudzenia neuronów. Równocześnie wykazano wręcz przeciwne działanie CaMKII (Nichols i wsp., 1990). Stwierdzono doświadczalnie, że zwierzęta o zakłóconej na skutek manipulacji genetycznych funkcji omawianej kinazy, demonstrują większą podatność na ischemię (Waxham i wsp., 1996). O roli CaMKII w ischemii świadczy także fakt, że poddanie zwierząt hipotermii zapobiega zarówno spadkowi aktywności fosforylacyjnej jak i śmierci neuronów (Churn i wsp., 1990).

MATERIAŁ I METODY

1. Materiał doświadczalny

Badania przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar (samce) o masie ciała 180-200 g i chomikach mongolskich (gerbilach), (*Merinos unquiculatus*), o masie ciała 50 - 70 g.

Zwierzęta pochodziły z hodowli ICMDiK PAN i do momentu doświadczeń były karmione i pojone *ad libitum* w naturalnym cyklu dobowym. Po odwracalnym niedokrwieniu mózgu przetrzymywane były w podobnych warunkach przez okres czasu podany w opisie doświadczenia.

2. Modele niedokrwienia

2.1. Niedokrwienie wywołane zatrzymaniem akcji serca (cardiac arrest)

Szczurom w narkozie halotanowej (2.5% halotanu w O₂/N₂O (30:70, v/v) podawano dosercowo nasycony roztwór KCl (1 ml) (Katsura i wsp.,1993). Do momentu uśmiercenia zwierząt utrzymywano temperaturę rektalną na poziomie 37°C. W określonym czasie po zatrzymaniu akcji serca mrożono mózg *in situ*, wprowadzając ciekły N₂ bezpośrednio na odsłoniętą pokrywę czaszki (Ponten i wsp.,1973). Izolowanie mózgu prowadzono zgodnie z metodą Tzigaret i wsp. (1993), utrzymując w czasie preparatyki temperaturę 0°C.

2.2 Niedokrwienie odwracalne

Niedokrwienie mózgu chomika mongolskiego wywoływano przez zaciśnięcie obu tętnic szyjnych wspólnych. W czasie zabiegu stosowano narkozę halotanową. Początkowe stężenie halotanu wynosiło 2.5% w O₂/N₂O (30:70, v/v), po czym obniżano je do 1.5%. Temperaturę rektalną utrzymywano na poziomie 37°C. Zwierzęta uśmiercano bezpośrednio po epizodzie niedokrwieniowym trwającym od 0.5 - 5

minut lub w określonym czasie po przywróceniu krążenia. Grupę kontrolną stanowiły chomiki mongolskie poddane całej procedurze chirurgicznej, ale bez zaciskania tętnic szyjnych. U wszystkich zwierząt stosowano opisaną w punkcie 2.1. metodę mrożenia mózgów *in situ*. Struktury mózgu (korę przodomózgowia i hipokamp) izolowano w temperaturze 0°C bezpośrednio przed homogenizacją.

2.3. Farmakologiczne modyfikacje reakcji mózgu na ischemię

Przed zabiegiem chirurgicznym podawano zwierzętom dizocypinę (MK 801), niekompetycyjny inhibitor receptora NMDA. Roztwór związku w soli fizjologicznej (0.8 mg/ml) podawano dootrzewnowo w dawce 0.8mg/kg wagi ciała 30 minut przed wywołaniem niedokrwienia (Gill i wsp.,1992).

3. Przygotowanie tkanki do badania aktywności i lokalizacji CaMKII

Wyizolowane struktury homogenizowano ręcznie (teflon/szkło) w buforze zawierającym inhibitory enzymów proteolitycznych i fosfataz (Yano i wsp.,1994) o składzie: 50 mM HEPES (pH 7.5); 4 mM EGTA; 10 mM EDTA, 15 mM Na₄P₂O₇; 100 mM β-glicerofosforan, 25 mM NaF, 0.1 mM leupeptyna, 75 μM pepstatynaA, 0.05 mg/ml aprotinina, 1 mM DTT, i 0.1% Triton X-100. Homogenaty (10%w/v) wirowano przy 12 000g przez 10 minut w temperaturze 4°C. Aktywności enzymatyczne oznaczano w zebranych nadsączach.

Do badań lokalizacji CaMKII tkankę homogenizowano w buforze nie zawierającym Tritonu X-100. W uzyskanej przez wirowania homogenatów (12 000 x g przez 30 minut) frakcji rozpuszczalnej (określanej w pracy również jako frakcja cytosolowa) i w osadzie zwanym dalej frakcją cząsteczkową lub (niezbyt precyzyjnie) błonową, oznaczano poziom białka podjednostki αCaMKII metodą immunochemiczną (Western blot).

4. Oznaczenie aktywności CaMKII

Aktywności CaMKII oznaczano mierząc szybkość przeniesienia znakowanych [^{32}P] reszt fosforanowych z γATP na peptydowy substrat - syntide 2 (GIBCO BRL), używany powszechnie w oznaczeniach aktywności kinazy II (Hashimoto i wsp., 1987; Payne i wsp., 1988; Fukunaga i wsp., 1989).

Oznaczano trzy formy aktywności kinazowej, różniące się stopniem fosforylacji :

- aktywność całkowitą, (oznaczaną w obecności Ca^{2+} i kalmoduliny),
- niezależną od Ca^{2+} aktywność endogenną, (oznaczaną w obecności EGTA), będącą wyznacznikiem puli enzymu, który został zaktywowany (ufosforylowany) *in vivo*,
- niezależną od Ca^{2+} maksymalną aktywność kinazową, oznaczaną po uprzedniej autofosforylacji *in vitro* wszystkich cząsteczek enzymu (Molloy, Kennedy, 1991).

Aktywność CaMKII mierzono w liczniku scyntylacyjnym (LKB, Wallac 1409) i wyrażono w μmolach [$^{32}\text{PO}_4^{-3}$] przyłączonych do substratu przez 1 mg białka w czasie 1 minuty.

5. Autofosforylacja CaMKII

Reakcję autofosforylacji CaMKII przeprowadzano w homogenatach mózgów zwierząt kontrolnych w obecności wapnia i kalmoduliny w sposób identyczny jak pomiar aktywności enzymu, z tym jednak wyjątkiem, że mieszanina reakcyjna nie zawierała syntetycznego substratu. Po zatrzymaniu reakcji mieszaninę reakcyjną rozdzielano elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Dalsze postępowanie zależało od rodzaju eksperymentu. W części doświadczeń białka przenoszono na membranę nitrocelulozową (Towbin i wsp., 1979) i poddawano detekcji immunochemicznej (Western blot), podczas gdy w innych badaniach wykonywano autoradiografię wysuszonych żeli.

6. Analiza immunochemiczna

Poziom białka CaMKII w natywnych homogenatach i frakcjach (rozpuszczalnej i cząsteczkowej), oceniano przy pomocy Western blotu. Reakcję immunochemiczną z monoklonalnym przeciwciałem, specyficznym dla podjednostki α CaMKII (Boehringer Mannheim), prowadzono według protokołu podanego przez producenta. Dla uwidocznienia reakcji stosowano metodę wzmocnionej chemiluminescencji (ECL), wykorzystując zestaw E-My Amersham. Natężenie immunoreaktywności, będące markerem poziomu białka α CaMKII, określano densytometrycznie w zakresie liniowego przebiegu (Pharmacia LKB, UltroScan XL).

7. Immunoprecypitacja

Supernatanty, otrzymane w wyniku wirowania ekstrahowanych Tritonem X100 homogenatów, inkubowano z przeciwciałem anti- α CaMKII i zawiesiną Proteina A-sefaroza CL-4B (ang. Sepharose) (Pharmacia). Jedną część utworzonego immunokompleksu poddawano autofosforylacji przy pomocy [γ ³²P] ATP w obecności wapnia i kalmoduliny i rozdzielali elektroforetycznemu (SDS-PAGE). Poziom radioaktywności białka α CaMKII określano autoradiograficznie. Immunoprecypitat nie fosforylowany, po rozdziale elektroforetycznym, barwiono błękitem Coomassie.

8. Inne procedury

8.1. Stężenie białka

Stężenie białka oznaczano metodą Bradforda (1976).

8.2. Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki przedstawiono jako wartości średnie z szeregu doświadczeń. Ilość powtórzeń zaznaczono w opisie rycin. Obliczano standardowy błąd średniej dla grupy wyników (SEM) lub odchylenie standardowe (SD). Różnice między średnimi oceniano za pomocą analizy wariancji (ANOVA) a poziom istotności statystycznej różnic testem t Studenta (Pharmacological Calculation System Program).

WYNIKI

1. Wpływ niedokrwienia wywołanego zatrzymaniem akcji serca na zachowanie CaMKII w mózgu szczura

1.1. Aktywności enzymatyczne CaMKII

Celem tej części badań było określenie wpływu ostrego epizodu ischemicznego na aktywności enzymatyczne CaM KII z uwzględnieniem proporcji form różniących się stopniem aktywacji/fosforylacji.

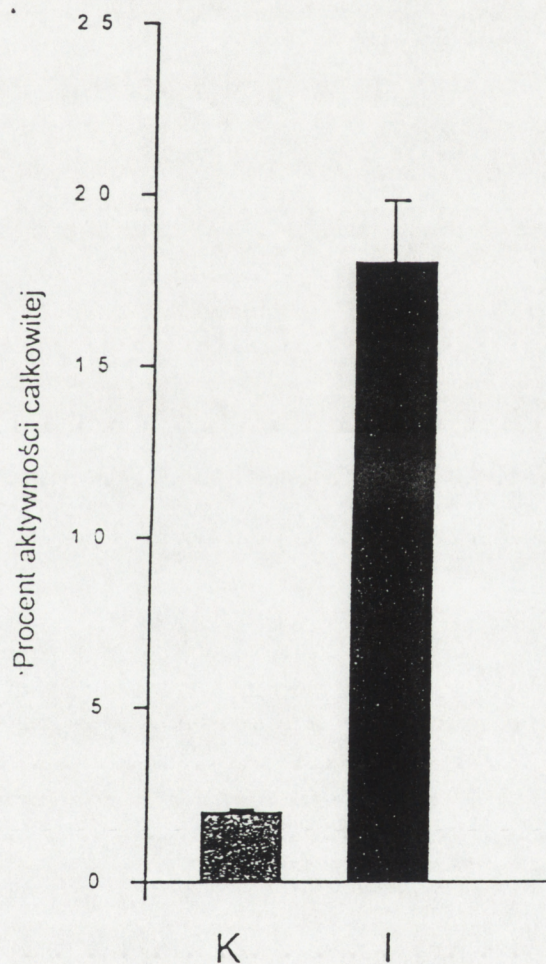
Tabela 1. Wpływ niedokrwienia na aktywności CaMKII w mózgu szczura

	Aktywność (nmole/mg/min)	
	Kontrola	Ischemia
Całkowita	101 ± 4.8	8.3 ± 0.9
Endogenna Ca ²⁺ - niezależna	2.2 ± 0.2	1.9 ± 0.4
Maksymalna Ca ²⁺ - niezależna	48.3 ± 0.7	4.3 ± 0.1

Aktywności CaMKII oznaczano w obecności Ca²⁺ i kalmoduliny (aktywność całkowita) lub w obecności EGTA (endogenna aktywność niezależna od Ca²⁺). Niezależną od Ca²⁺ aktywność maksymalną oznaczano po autofosforylacji cząsteczek kinazy *in vitro*. Autofosforylację prowadzono przez 1 minutę w obecności wapnia i kalmoduliny, z wyłączeniem substratu (syntidu 2). Po tym czasie do badanych prób dodawano substrat lub substrat z EGTA i reakcję kontynuowano przez następną minutę. Aktywność maksymalną obliczono z różnicy radioaktywności znakowanych [³²P] reszt fosforanowych przeniesionych na substrat w obecności i przy braku EGTA.

Każda wartość jest średnią arytmetyczną ± SD uzyskaną w wyniku analizy 3 zwierząt przy trzech powtórzeniach każdego oznaczenia.

Wyniki zamieszczone w tabeli 1 wskazują, że zatrzymanie akcji serca powoduje dramatyczne, ponad 90%-owe obniżenie całkowitej aktywności fosforylacyjnej: ze 101 do 8.3 nmoli/min/mg białka. Ischemia mózgu trwająca 15 minut nie zmienia natomiast bezwzględnych wartości niezależnej od wapnia aktywności endogennej, reprezentującej formę enzymu, która została zaktywowana (ufosforylowana) *in vivo*. Jednak podkreślić należy, że w tych warunkach następuje dziesięciokrotny (z 2 do 20%) wzrost względnego udziału tej autonomicznej formy enzymu w odniesieniu do obniżonej przez ischemię aktywności całkowitej (ryc. 1).



Ryc. 1. Wpływ niedokrwienia na udział formy Ca^{2+} -niezależnej w całkowitej aktywności CaMKII w mózgu szczura.

Aktywność kinazową oznaczano w obecności EGTA i wyrażono w wartościach względnych w odniesieniu do aktywności całkowitej przyjętej za 100%.

Prezentowane wartości są średnimi arytmetycznymi \pm SD uzyskanymi w wyniku analizy 3 zwierząt przy trzech powtórzeniach każdego oznaczenia.

K - kontrola; I - niedokrwienie

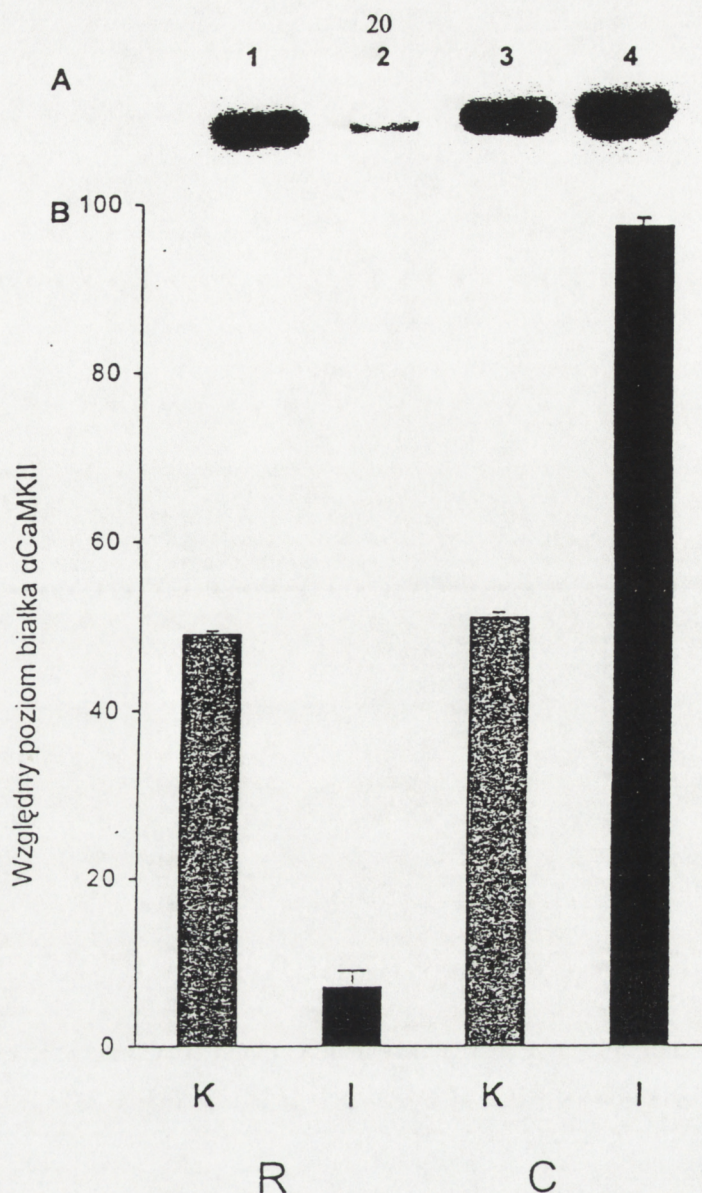
Oznaczono również maksymalne wartości niezależnej od wapnia formy CaMKII, otrzymywane w badanych próbach po ich wymuszonej autofosforylacji *in vitro*. Prezentowane w tabeli 1 wyniki wskazują, że niezależnie od bezwzględnych wartości aktywności całkowitej, zawsze 50% enzymu maksymalnie może występować w formie autonomicznej. Można więc przyjąć, że ilość potencjalnych miejsc autofosforylacji w cząsteczce CaMKII nie ulega zmianie, niezależnie od stopnia poischemicznej inhibicji aktywności całkowitej. Natomiast miejsca te są fosforylowane *in vivo* w około 4% w kontroli i aż w 40% po niedokrwieniu.

Obserwowane po ostrym niedokrwieniu równomierne obniżenie specyficznej aktywności całkowitej i niezależnej od wapnia aktywności maksymalnej CaMKII oraz równoczesny wzrost względnego udziału formy autonomicznej, aktywowanej/fosforylowanej endogennie, może pośrednio świadczyć o zwiększonej autofosforylacji enzymu w mózgu w okresie stresu ischemicznego.

*Ischemia nie zmienia aktywności specyficznej formy autonomicznej, reprezentującej tę pulę enzymu, która uległa aktywacji/fosforylacji *in situ*.*

1.2. Lokalizacja subkomórkowa i poziom białka podjednostki α CaMKII (50kDa) w mózgu szczura.

Celem podjętych badań było wyjaśnienie, czy opisane wyżej poniedokrwienne obniżenie katalitycznej aktywności całkowitej jest konsekwencją degradacji białka enzymatycznego. Ilość białka podjednostki α CaMKII (50 kDa) we frakcjach: cząsteczkowej i rozpuszczalnej, uzyskanych przez rozwirowanie homogenatu oceniano metodą immunochemiczną. Wyniki prezentuje rycina 2 A i B. Densytometryczna analiza immunoreaktywności, przedstawiająca względne ilości enzymu w badanych frakcjach wskazuje na niemal równe rozmieszczenie enzymu pomiędzy badanymi frakcjami w mózgach zwierząt kontrolnych. Dystrybucja białka ulega znaczącym zmianom pod wpływem ostrego stresu ischemicznego.



Ryc. 2. Poziom białka CaMKII w badanych frakcjach (rozpuszczalnej i cząsteczkowej) mózgu szczura w kontroli i po niedokrwieniu.

A. Reprezentatywny Western blot demonstrujący poziom α CaMKII we frakcjach: rozpuszczalnej i cząsteczkowej.
Na żel poliakrylamidowy (10%) nakładano po 12 μ g białka analizowanych frakcji wg następującego wzoru: 1 - frakcja rozpuszczalna mózgu kontrolnego; 2 - frakcja rozpuszczalna mózgu ischemicznego; 3 - frakcja cząsteczkowa mózgu kontrolnego; 4 - frakcja cząsteczkowa mózgu ischemicznego
Reakcję immunochemiczną prowadzono z przeciwciałem specyficznym dla podjednostki α CaMKII. Dla uwidocznienia reakcji stosowano metodę wzmocnionej chemiluminescencji.

B. Lokalizacja α CaMKII w badanych frakcjach mózgu szczura w kontroli (K) i po niedokrwieniu (I).
Dane prezentowane na rycinie uzyskano przy użyciu ilościowej analizy densytometrycznej przedstawionego Western blotu (A). Poziom białka α CaMKII wyrażono w wartościach względnych w odniesieniu do poziomu w homogenacie, przyjętego za 100%.
Każda wartość jest średnią arytmetyczną \pm SD uzyskaną w wyniku analizy trzech zwierząt przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia.
R-frakcja rozpuszczalna C- frakcja cząsteczkowa

Drastycznemu obniżeniu ilości enzymu we frakcji rozpuszczalnej towarzyszy proporcjonalny jego wzrost we frakcji cząsteczkowej. Niedokrwienie nie zmienia natomiast całkowitego poziomu białka CaMKII w homogenacie mózgu.

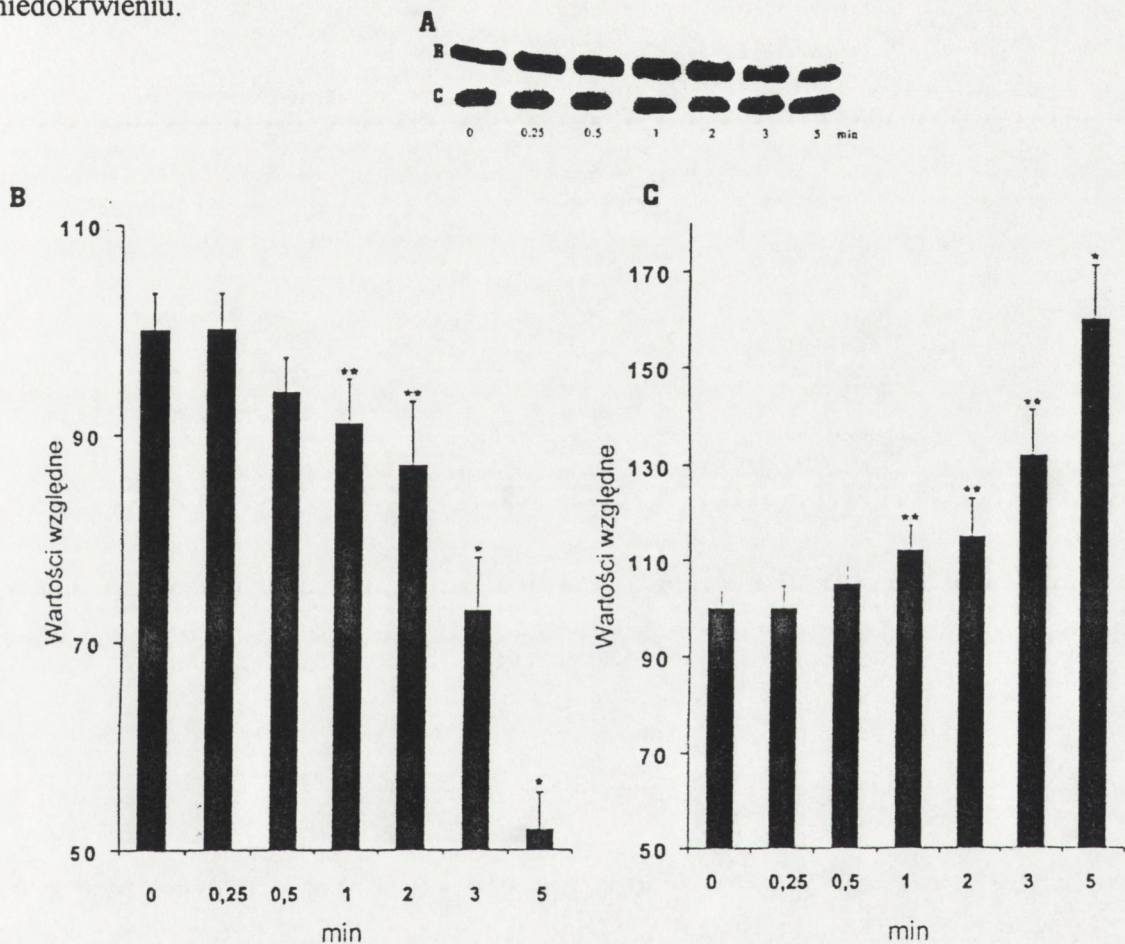
Poischemiczna inhibicja aktywności CaMKII nie jest wynikiem degradacji białka enzymatycznego.

Przemieszczenie białka CaMKII do frakcji cząsteczkowej w odpowiedzi na ostry stres niedokrwienno może być związane z obserwowanym po niedokrwieniu obniżeniem aktywności katalitycznej enzymu.

1.3. Autofosforylacja CaMKII w homogenatach mózgu *in vitro* i jej wpływ na lokalizację subkomórkową enzymu.

Jednym z sugerowanych mechanizmów molekularnych, odpowiedzialnych za translokację CaMKII do błon plazmatycznych (Churn i wsp., 1990 a), jest wzmożona autofosforylacja cząsteczki enzymu. Zatem kolejnym, podjętym przez nas problemem badawczym, stało się wykazanie roli autofosforylacji CaMKII w procesie jej przemieszczania do frakcji błon plazmatycznych w warunkach niedokrwienia. W tym celu homogenat z mózgu zwierzęcia kontrolnego poddano autofosforylacji, zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale Materiał i Metody. Po zakończeniu reakcji i rozwirowaniu homogenatu poziom białka enzymatycznego oznaczano przy pomocy immunobarwienia. Wyniki przedstawione na ryc. 3 demonstrują, że autofosforylacja *in vitro* rzeczywiście indukuje przemieszczenie enzymu z cytosolu do frakcji błonowej. Ubytek CaMKII we frakcji rozpuszczalnej pogłębiał się równolegle z wydłużeniem czasu fosforylacji i po 5 minutach sięgał prawie 50%. Obniżeniu poziomu białka w cytosolu towarzyszył równoczesny proporcjonalny przyrost ilości CaMKII we frakcji błonowej. Równolegle z wydłużeniem czasu fosforylacji obserwuje się tendencję do zmiany elektroforetycznej ruchliwości części immunoreaktywnego białka z 50 do 53 kDa. Ze względu na niewielki stopień rozdzielczości obu białek nie jest możliwa ocena ilościowa ufosforylowanej frakcji enzymu. Obecność tej frakcji po immunobarwieniu

zaznacza się jedynie poszerzeniem immunoreaktywnego prążka CaMKII. Powoduje to wrażenie, szczególnie na oryginalnym immunoblocie, że intensywność sygnału na przedstawionej rycinie wydaje się być nieco zredukowana, pomimo że całkowita ilość białka CaMKII w homogenacie nie ulega zmianie. Opisane zmiany dystrybucji CaMKII po autofosforylacji wydają się być w pełni analogiczne do zmian wykazanych po niedokrwieniu.



Ryc. 3. Wpływ autofosforylacji α CaMKII na jej subkomórkową lokalizację w mózgu szczura.

A. Reprezentatywne Western bloty przedstawiające poziomy białka α CaMKII we frakcji rozpuszczalnej (R) i cząsteczkowej (C) po autofosforylacji homogenatów *in vitro*. Reakcję autofosforylacji prowadzono w czasie 0.25 - 5 minut w obecności Ca^{2+} i kalmoduliny. Poziomy α CaMKII oznaczano immunochemicznie z przeciwciałem specyficznym dla tej podjednostki kinazy. Reakcję uwiadczniano metodą wzmocnionej chemiluminescencji. Wykresy ilustrują względną ilość białka α CaMKII we frakcji rozpuszczalnej (B) i cząsteczkowej (C) uzyskane w wyniku ilościowej analizy densytometrycznej przedstawionych Western blotów (A). Wartości przedstawione w % kontroli reprezentującej średnie poziomy białka enzymatycznego przed autofosforylacją *in vitro*. Każda wartość jest średnią arytmetyczną \pm SD uzyskaną w wyniku analizy trzech zwierząt przy dwóch powtórzeniach każdego z oznaczeń. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej są zaznaczone * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$.

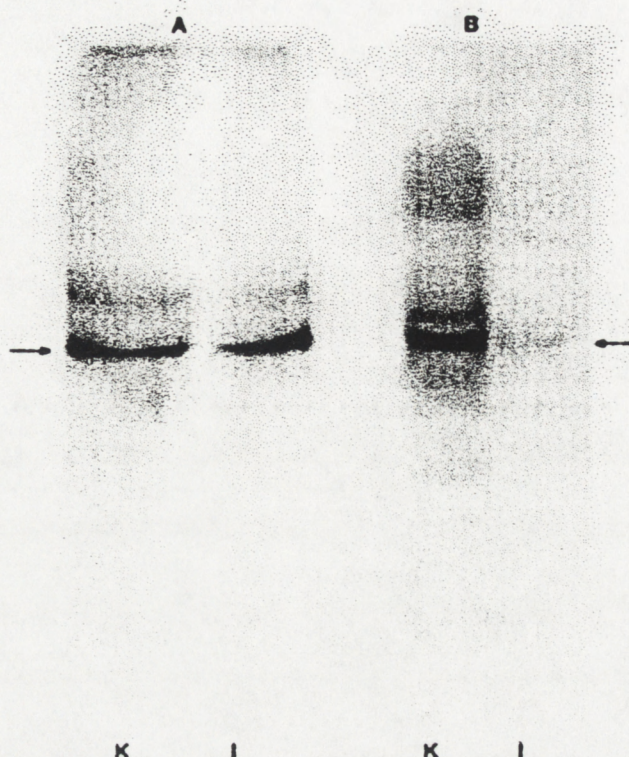
Stymulowana przez wapń i kalmodulinę intramolekularna autofosforylacja enzymu może odpowiadać za obserwowaną w niedokrwieniu translokację CaMKII w kierunku błon plazmatycznych.

1.4. Autofosforylacja immunoprecypitowanej CaMKII *ex vivo*

Opisane wyżej wyniki sugerują, że endogenna autofosforylacja może częściowo odpowiadać za obserwowane poischemiczne zmiany aktywności enzymatycznej i lokalizacji subkomórkowej CaMKII. Dlatego też w dalszej części badań staraliśmy się określić, czy enzym badany po ischemii posiada nadal zdolność do autofosforylacji *in vitro*, co wskazywałoby na zachowanie wolnych miejsc fosforylacji (ang. back-phosphorylation).

W tym celu z homogenatów mózgu zwierzęcia kontrolnego jak i poddanego niedokrwieniu immunoprecypitowano CaMKII i poddawano autofosforylacji radioaktywnym [γ ^{32}P]ATP. Otrzymane wyniki przedstawia ryc. 4. Poziom białek immunoprecypitowanych z homogenatu mózgu zwierzęcia poddanego niedokrwieniu nie różnił się od poziomów kontrolnych (barwienie błękitem Coomassie) (4A). Istotne różnice w zdolności CaMKII do autofosforylacji *in vitro* wykazała natomiast analiza autoradiogramów, co demonstrowa ryc.4B. Podjednostka 50 kDa CaMKII z mózgu zwierzęcia poddanego niedokrwieniu ulegała jedynie nieznacznemu ufosforylowaniu w porównaniu z enzymem izolowanym z mózgu zwierzęcia kontrolnego.

Na tej podstawie można przypuszczać, że CaMKII została bądź ufosforylowana bądź też tak zmieniona *in situ* w czasie niedokrwienia, że przyłączenie następnych grup fosforanowych w układzie *in vitro* stało się niemożliwe. Na korzyść pierwszej z tych możliwości przemawia równoległa ischemiczna translokacja enzymu do błon zależna, jak wykazano, od autofosforylacji cząsteczki białka.



Ryc. 4. Wpływ niedokrwienia na fosforylację CaMKII po immunoprecypitacji.

Z supernatantów otrzymanych po wirowaniu traktowanych Tritonem X 100 homogenatów mózgu zwierzęcia kontrolnego (K) i poddanego niedokrwieniu (I) immunoprecypitowano CaMKII z przeciwciałem specyficznym dla podjednostki α . Część wytworzonego immunokompleksu poddawano bezpośrednio elektroforezie i barwiono błękitem Coomassie (A), podczas gdy pozostały immunokompleks poddawano najpierw autofosforylacji przy udziale $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ w obecności Ca^{2+} i kalmoduliny a następnie rozdzielowi elektroforetycznemu. Poziom radioaktywności oznaczano autoradiograficznie.

A. Poziom αCaMKII immunoprecypitowanej z homogenatu mózgu zwierzęcia kontrolnego (K) i poddanego ischemii (I). Po rozdziale na żelu poliakrylamidowym białka wybarwiano błękitem Coomassie.

B. Autoradiogram przedstawiający wbudowanie $[^{32}\text{P}]$ *in vitro* do immunoprecypitowanej αCaMKII z homogenatu mózgu zwierzęcia kontrolnego (K) i poddanego ischemii (I). Pozycje CaMKII zaznaczono strzałkami.

Mechanizm gwałtownej inhibicji CaMKII w niedokrwionym mózgu może polegać na nieodwracalnej, patologicznej fosforylacji tego białka, co w konsekwencji blokuje ciągły cykl fosforylacji/defosforylacji, konieczny dla pełnej aktywności katalitycznej.

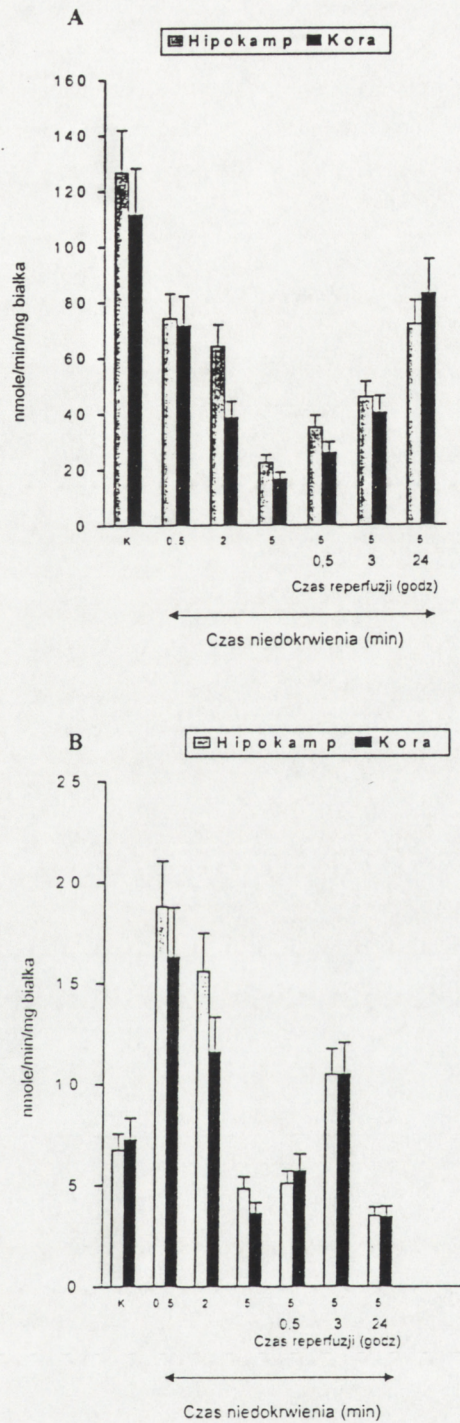
2. Wpływ niedokrwienia odwracalnego i reperfuzji na zachowanie CaMKII w korze mózgu chomika mongolskiego

2.1. Dynamika zmian aktywności CaMKII

Prezentowane na wykresie wyniki badań wskazują na wyjątkową wrażliwość CaMKII na niedokrwienie (ryc.5). Już po 0.5 minuty od momentu zablokowania dopływu krwi do mózgu całkowita aktywność katalityczna (oznaczana w obecności wapnia i kalmoduliny) zarówno w korze mózgu jak i hipokampie obniżała się o 40% w porównaniu z aktywnością wyjściową (wynoszącą odpowiednio 111.5 i 126.7 nmoli/min/mg białka) (ryc. 5A). Wydłużenie czasu trwania epizodu do 5 minut pogłębiało spadek aktywności do 80%. Po przywróceniu krążenia krwi aktywność wykazywała wyraźną tendencję do stopniowego powrotu do poziomów kontrolnych, aczkolwiek jeszcze po 24 godzinach reperfuzji była niższa o 40% od wartości początkowej.

Odmienne charakter zmian demonstrowała oznaczana równolegle aktywność enzymatyczna niezależna od wapnia, reprezentująca formę autonomiczną CaMKII, indukowaną podczas stresu ischemicznego (ryc. 5B). Po zatrzymaniu dopływu krwi na 0.5 minuty niezależna od wapnia aktywność fosforylacyjna rosła ponad dwukrotnie w porównaniu z aktywnością wyjściową i utrzymywała się na podwyższonym poziomie przy przedłużeniu czasu niedokrwienia do 2 minut. Zgodnie z prezentowanymi wynikami badań, stymulację tę wykryć można jedynie w bardzo wczesnej fazie uszkodzenia ischemicznego. Już po 5 minutach niedokrwienia aktywność formy autonomicznej zmniejszała się o 30% w stosunku do wartości wyjściowej a następnie w czasie 24 godzin reperfuzji pozostawała na niemal stałym, zbliżonym do kontrolnego poziomie.

Na uwagę zasługuje fakt, że pomimo nie zmieniających się w okresie reperfuzji bezwzględnych wartości specyficznej aktywności formy autonomicznej, w sposób znaczący zwiększał się jej względny udział w odniesieniu do aktywności całkowitej: z 5% w mózgach zwierząt kontrolnych do 20%-30% u zwierząt poddanych ischemii i reperfundowanych, niezależnie od czasu reperfuzji i strukturalnej wrażliwości na ischemię (kora vs hipokamp).



Ryc. 5. Zmiany aktywności CaMKII w korze przodomózgowia i hipokampie mózgu chomika mongolskiego w czasie niedokrwienia i reperfuzji.

Aktywność CaMKII oznaczano w obecności wapnia i kalmoduliny (aktywność całkowita, ryc. 5A) lub w obecności EGTA (aktywność niezależna od wapnia, ryc 5B). Każda wartość jest średnią arytmetyczną \pm SD uzyskaną w wyniku analizy 6 zwierząt przy trzech powtórzeniach każdego oznaczenia.

2.2. Lokalizacja subkomórkowa CaMKII

Celem podjętych badań było sprawdzenie, czy trwająca 5 minut ischemia odwracalna wpływa w sposób istotny na poziom białka CaMKII i jego subkomórkowe rozmieszczenie tak w okresie ostrym jak i reperfuzji.

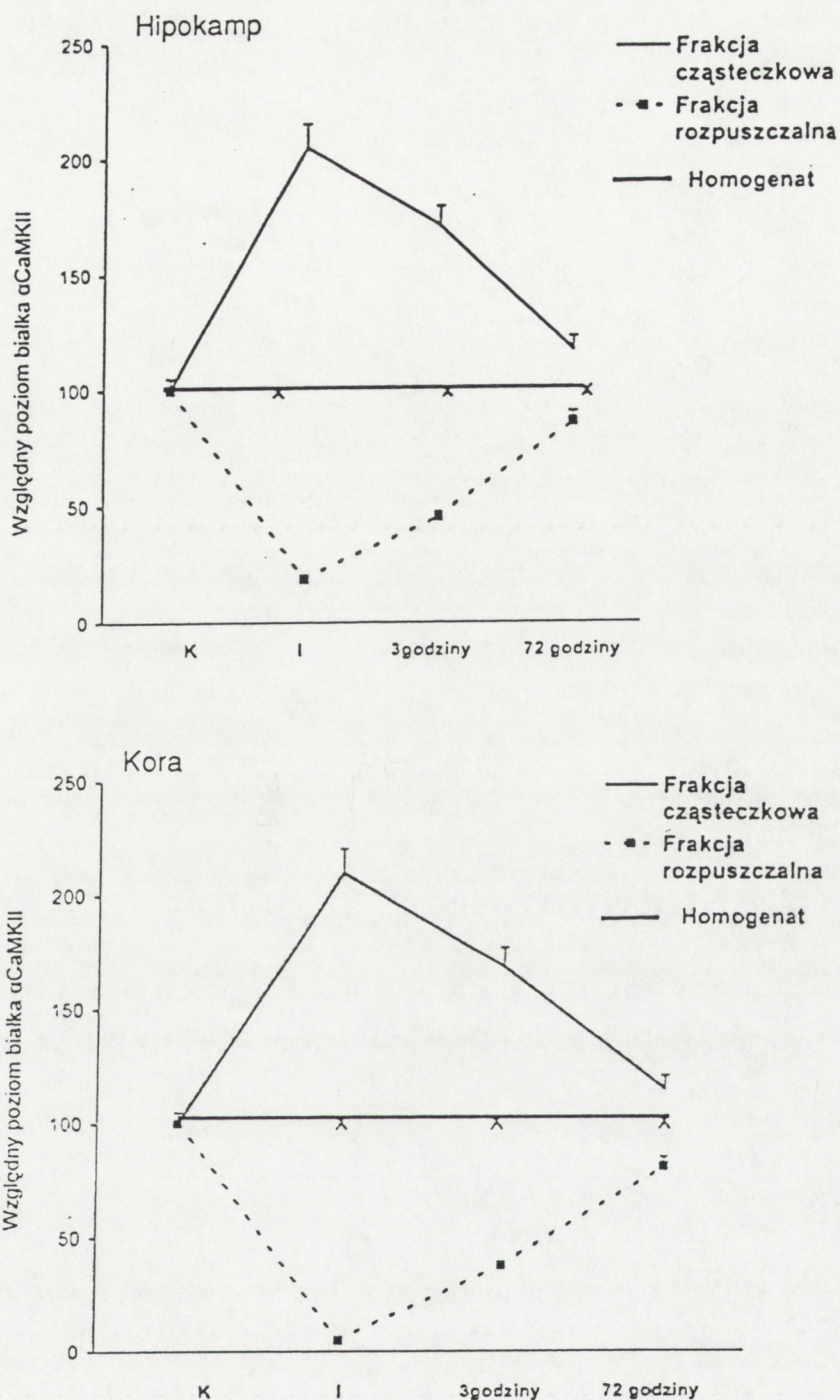
Poziom białka w homogenatach oraz we frakcjach otrzymanych po ich rozwirowaniu oceniano metodą immunochemiczną, podobnie jak w przypadku badań nad nieodwracalnym niedokrwieniem wywołanym zatrzymaniem akcji serca. Uzyskane wyniki, prezentowane w formie wykresów (ryc.6) wskazują jednoznacznie, że w czasie 5 minutowego niedokrwienia ilość CaMKII w homogenatach zarówno kory przedmózgowia jak i hipokampa nie ulegała zmianie. Pomimo braku ilościowych zmian białka podjednostki α CaMKII w homogenatach, zaobserwowano zależne od czasu trwania epizodu ischemicznego przemieszczenie rozpuszczalnej frakcji CaMKII do błon plazmatycznych. Wyniki analizy densytometrycznej wykonanych Western blotów przedstawione są w tabeli 2. Uzyskane dane wskazują na istotny przyrost poziomu białka enzymatycznego we frakcji cząsteczkowej już po 2 minutach niedokrwienia. Przedłużenie ischemii do 5 minut prowadziło do niemal całkowitego przemieszczenia białka podjednostki α CaMKII z nadsącza do osadu (frakcji cząsteczkowej). Podobny efekt obserwowano w modelu niedokrwienia wywołanego przez zatrzymanie akcji serca (ryc.2).

Tabela 2. Wpływ ischemii na względne poziomy białka α CaMKII we frakcji cząsteczkowej wybranych struktur mózgu chomika mongolskiego w czasie ischemii

		Hipokamp	Kora
Kontrola		41.6 ± 2.9	41.3 ± 5.4
Ischemia	0.5 min	52.0 ± 3.8	47.5 ± 4.4
	2 min	65.0 ± 5.9	76.7 ± 7.3
	5 min	≈ 100	≈ 100

Dane zamieszczone w tabeli prezentują względne poziomy białka α CaMKII (w stosunku do przyjętego za 100% poziomu tego białka w homogenacie) otrzymane na podstawie analizy densytometrycznej Western blotów. Każda wartość zamieszczona w tabeli jest średnią arytmetyczną \pm SD uzyskaną w wyniku analizy trzech zwierząt przy dwukrotnym powtórzeniu każdego oznaczenia.

W okresie reperfuzji widoczna jest tendencja do stopniowej normalizacji dystrybucji CaMKII i w konsekwencji po 72 godzinach ilość białka w badanych frakcjach prezentowała wartości zbliżone do kontrolnych (ryc.6). Nie stwierdzono przy tym żadnych istotnych różnic w dynamice zmian poischemicznych pomiędzy korą przodomózgowia i hipokampem.



Ryc. 6. Wpływ niedokrwienia i reperfuzji na poziom CaMKII w homogenacie i jego lokalizację wewnątrzkomórkową w wybranych strukturach mózgu

Wykresy przedstawiają poziomy białka α CaMKII bezpośrednio po 5 minutach niedokrwienia i w różnym czasie reperfuzji. Oznaczenia wykonano we frakcjach: rozpuszczalnej i cząsteczkowej homogenatów hipokampa i kory przodomózgowia oraz w natywnych homogenatach. Dane prezentowane na rycinie uzyskano przy użyciu analizy densytometrycznej odpowiednich Western blotów i przedstawiono w wartościach względnych w stosunku do kontroli przyjętej za 100%.

Każda wartość jest średnią arytmetyczną \pm SD uzyskaną w wyniku analizy 6 zwierząt przy trzech powtórzeniach każdego oznaczenia.

Na wykresie zaznaczone odchylenia standardowe przekraczające 5%.

Porównanie dynamiki zmian aktywności całkowitej CaMKII i jej lokalizacji subkomórkowej w okresie niedokrwienia i reperfuzji wskazuje na fakt, że dominująca faza inhibicji aktywności katalitycznej, mająca miejsce po 5 minutach niedokrwienia, jest prawdopodobnie poprzedzona istotną przejściową translokacją białka enzymatycznego do frakcji błonowej.

Jedną z pierwszych odpowiedzi na niedokrwienie wydaje się być krótkotrwała aktywacja natywnego enzymu in situ. Obserwowana jest ona już po 0,5minuty niedokrwienia i wyraża się krótkotrwałym wzrostem bezwzględnych wartości aktywności niezależnej od wapnia, które następnie powracają do wartości zbliżonych do kontroli.

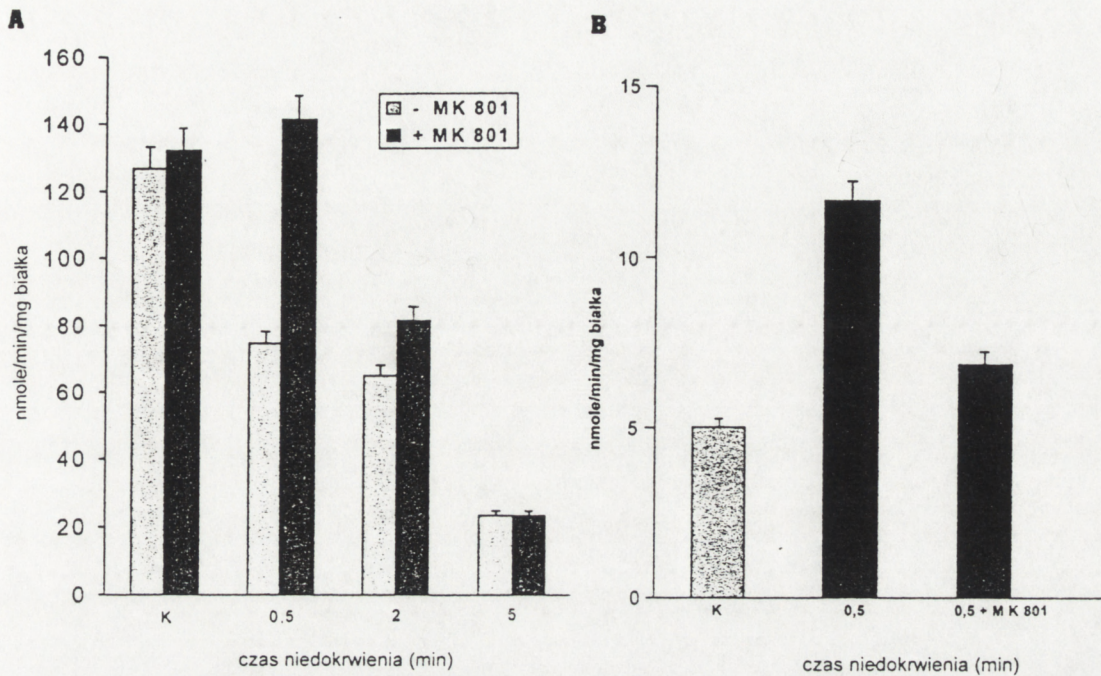
Zmiany aktywności CaMKII jak i lokalizacji mają charakter odwracalny i po 72 godzinach reperfuzji prezentują wartości zbliżone do kontrolnych.

Zaobserwowano brak selektywności w reakcji CaMKII na ischamię (kora przedmózgowia vs hipokamp).

2.3. Wpływ antagonisty receptora/kanału NMDA - MK801 na aktywność CaMKII

Podjęte badania zmierzały do wyjaśnienia, czy związek hamujący napływ wapnia do wnętrza komórki może przeciwdziałać poischemicznej inhibicji CaMKII.

W eksperymentach zastosowano niekompetycyjnego antagonistę receptora/kanału NMDA - MK801. Ze względu na brak selektywności wywołanych niedokrwieniem zmian w aktywności CaMKII w mózgu, zamieszczono jedynie dane dotyczące hipokampa. Wyniki przedstawione w formie wykresu wskazują, że podanie MK801 osłabia inhibicję całkowitej aktywności kinazy po ischemii trwającej 0.5 minuty (ryc.7A) i obniża początkową aktywację formy niezależnej od wapnia (ryc.7B). Równolegle z wydłużeniem czasu niedokrwienia do 2 minut obserwowano osłabienie efektu protekcyjnego, natomiast bezpośrednio po 5 minutach ischemii (ryc.7A) jak i po 3 godzinach reperfuzji MK 801 nie wykazywał żadnego wpływu na aktywność enzymatyczną CaMKII. Reasumując powyższe wyniki, MK801 opóźniał inhibicję CaMKII oraz indukcję formy Ca^{2+} -niezależnej jedynie we wczesnej fazie uszkodzenia poischemicznego.



Ryc. 7. Wpływ MK-801 na indukowane ischemią zmiany aktywności CaMKII w hipokampie mózgu chomika mongolskiego.

Zwierzętom podawano dootrzewnowo MK-801 w dawce 0.8 mg/kg wagi ciała, 30 minut przed ischemią. Czas trwania niedokrwienia wynosił 0.5 - 5 minut. Aktywność CaMKII oznaczano w obecności Ca^{2+} i kalmoduliny (aktywność całkowita) (A) lub w obecności EGTA (aktywność niezależna od Ca^{2+}) (B).

Każda wartość jest średnią arytmetyczną \pm SD uzyskaną w wyniku analizy czterech zwierząt przy trzech powtórzeniach każdego oznaczenia.

Uzyskane wyniki mogą sugerować, że indukowana niedokrwieniem modulacja aktywności CaMKII może być w swojej początkowej fazie związana z napływem zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} na drodze aktywacji receptora/kanalu NMDA.

Wyniki prezentowane w tej części pracy potwierdzają wyjątkową wrażliwość CaMKII na niedokrwienie mózgu (Taft i wsp., 1988; Churn i wsp., 1990; 1990a; Aronowski i wsp., 1992; Morioka i wsp., 1992; Yamamoto i wsp. 1992; Hanson i wsp., 1994; Hu i Wieloch., 1995). Już po upływie 30 sekund od momentu zatrzymania dopływu krwi do mózgu notowano 40 %-owy spadek całkowitej aktywności CaMKII (mierzonej w obecności wapnia i kalmoduliny), który pogłębiał się równolegle z przedłużeniem czasu ischemii.

Mechanizm poischemicznej inhibicji CaMKII nie został dotychczas wyjaśniony w sposób jednoznaczny. Najwięcej zwolenników zyskuje sugestia (Aronowski i wsp., 1992; Churn i wsp., 1992), za którą przemawiają również wyniki prezentowane w tej pracy, że obniżenie aktywności jest następstwem posttranslacyjnej modyfikacji i/lub translokacji, jakiej w trakcie epizodu ischemicznego ulega cząsteczka enzymu. Za przejściową modyfikacją molekuly enzymu w przebiegu niedokrwienia przemawia zarówno wykazana przez nas odwracalność poischemicznego przemieszczenia CaMKII jak i powrót aktywności katalitycznej do wartości zbliżonych do kontroli w stosunkowo krótkim czasie 24 godzin reperfuzji. Biorąc pod uwagę powszechnie akceptowany fakt, że autofosforylacja enzymu jest najważniejszym mechanizmem regulującym aktywność CaMKII (Miller, Kennedy, 1986; Thiel i wsp., 1988; Dosemeci, Choi, 1997), jedną z możliwych posttranslacyjnych modyfikacji wydaje się być sekwencyjne przyłączenie grup fosforanowych do cząsteczki białka enzymatycznego. Za słusznością tego przypuszczenia przemawiają wyniki naszych doświadczeń wskazujące, że spadek całkowitej aktywności katalitycznej CaMKII po ischemii zbiega się z wyraźnym obniżeniem zdolności CaMKII do dodatkowej fosforylacji *in vitro* (ang. back phosphorylation), prawdopodobnie na skutek uprzedniej fosforylacji tej kinazy *in situ* w czasie ischemii.

Inny mechanizm obserwowanego spadku poischemicznej autofosforylacji CaMKII w układzie *in vitro* mógłby zakładać bliżej niezdefiniowane postranslacyjne modyfikacje,

dające w efekcie zablokowanie lub uniemożliwienie rozpoznania miejsca wiążącego ATP na molekułę kinazy (Churn i wsp., 1993).

W naszych badaniach, jak i w badaniach innych autorów, inaktywacja enzymu wydaje się być zbieżna z jego translokacją (Kolb i wsp., 1995; Hu, Wieloch, 1995). Mechanizmy odpowiedzialne za poischemiczną translokację nie są również wyjaśnione. Postuluje się, że warunki sprzyjające aktywacji CaMKII w następstwie towarzyszącego ischemii napływu wapnia do komórek przy niskich stężeniach ATP, mogą prowadzić do fosforylacji enzymu cytosolowego, co z kolei zwiększa jego asocjacyjne własności (ang. self associative) i prowadzi zarówno do translokacji jak również do inaktywacji aktywności katalitycznej (Hanson, Schulman, 1992; Hudman i wsp., 1993). Poparciem tej hipotezy są prezentowane wyniki wskazujące, że aktywacja/fosforylacja enzymu w układzie *in vitro* również prowadzi do jego przemieszczenia do frakcji błon.

Należy zaznaczyć, że dominująca faza inhibicji enzymu po ischemii była poprzedzona wyraźnym wzrostem aktywności formy niezależnej od wapnia, która następnie obniżała się do wartości równych kontroli w czasie przedłużającej się ischemii i reperfuzji. Zaobserwowanie natychmiastowej (po 0.5 minucie niedokrwienia) aktywacyjnej reakcji CaMKII, wyprzedzającej w czasie jej inhibicję, jest oryginalnym wynikiem, mogącym wskazywać na istotny mechanizm pobudzenia synaptycznego neuronów w początkowej fazie ischemii mózgu. Udział tej funkcjonalnie najistotniejszej, aktywnej *in situ* formy CaMKII w totalnej puli aktywności w układzie nerwowym waha się w literaturze od 1% (Aronowski i wsp., 1992) do zadziwiająco wysokiego poziomu 16% (Yamamoto i wsp., 1992) w normoksyjnych warunkach kontrolnych. W naszych badaniach Ca^{2+} -niezależna aktywność reprezentuje 2% totalnej puli CaMKII u szczura i 5% u gerbila w kontroli. Duży rozrzut cytowanych wyników można tłumaczyć różnicami metodycznymi w sposobie przygotowania materiału do oznaczeń. Stosowana w prezentowanych eksperymentach technika pobierania materiału po pierwotnym mrożeniu mózgu *in situ* jak i dalsze jego przygotowanie (utrzymanie warunków zabezpieczających przed endogenną fosforylacją/defosforylacją), eliminuje w dużym stopniu możliwe zmiany w poziomach wtórnych przekazników, generowane w czasie

preparatyki (Tzigaret i wsp., 1993). Z tego też powodu oznaczone proporcje pomiędzy różnymi formami CaMKII zbliżają się prawdopodobnie bardziej do rzeczywistego stanu autofosforylacji enzymu *in vivo*.

Biorąc pod uwagę fakt, że *in vitro* CaMKII wymaga około 100nM Ca^{2+} dla osiągnięcia 1/2 aktywności maksymalnej (Yamamoto i wsp., 1992), nie należałoby oczekiwać znaczącej aktywacji i autofosforylacji tego enzymu w spoczynkowych stężeniach wapnia wewnątrzkomórkowego. Zgodnie z akceptowanym schematem regulacji CaMKII aktywność ta powinna ulegać stymulacji dopiero w warunkach wzrostu $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dotychczas znalazło to potwierdzenie eksperymentalne jedynie w warunkach hodowli komórek *in vitro* (Gorelick i wsp. 1988; Fukunaga i wsp., 1989; Molloy, Kennedy, 1991; Morioka i wsp., 1995).

Badania *ex vivo*, będące przedmiotem prezentowanej pracy, dzięki zastosowanej procedurze mrożenia *in situ* wykazały po raz pierwszy, że niedokrwienie mózgu indukuje natychmiastowy wzrost aktywnych wapniowo-niezależnych cząsteczek enzymu, a dopiero później włączają się mechanizmy inhibicyjne, obserwowane poprzednio również przez innych autorów. Jednak nawet w tych warunkach, w których całkowita aktywność enzymu obniżała się o 80% lub więcej, frakcja aktywnej *in situ* (autonomicznej) formy kinazy była chroniona i utrzymywała się na względnie stałym poziomie we wszystkich badanych przez nas strukturach i modelach niedokrwienia.

Modulacja aktywności CaMKII we wczesnej fazie niedokrwienia wiąże się ze wzrostem stężenia wapnia w komórce. Badania z zastosowaniem MK801 wskazują na zaangażowanie receptora/kanalu NMDA i napływu wapnia do komórki w aktywację CaMKII w początkowym okresie ischemii mózgu. Brak efektu MK801 na aktywność badanej kinazy po epizodzie ischemicznym trwającym 5 minut i w czasie reperfuzji sugeruje sukcesywne włączanie się innych mechanizmów, regulujących poziom wapnia wewnątrzkomórkowego i aktywność CaMKII, niezależnie od receptora/kanalu NMDA. Mogą to być kanały wapniowe zależne od napięcia, kanały związane z receptorem AMPA, albo też uwalnianie wapnia z siateczki śródplazmatycznej (Manev i wsp., 1990; Mayer, Miller, 1990; Łazarewicz, 1996).

Podsumowanie:

Uzyskane wyniki upoważniają do stwierdzenia, że ischemia prowadzi do:

- zahamowania całkowitej aktywności CaMKII, jednak przy zachowaniu aktywności formy autonomicznej,
- początkowej krótkotrwałej (do 2 minut od przerywania dopływu krwi) aktywacji enzymu *in situ*, wyrażającej się przejściowym, bezwzględnym wzrostem aktywności formy niezależnej od wapnia. Następnie aktywność tej formy ulega również obniżeniu ale jedynie do wartości równych kontroli zarówno w czasie przedłużonej ischemii jak i reperfuzji,
- translokacji białka enzymatycznego w kierunku frakcji błonowej bez zmian w jego ilości całkowitej.

Sytuacja ta może być animowana przez autofosforylację enzymu *in vitro*, gdzie translokacja do błon zbiega się w czasie z inhibicją totalnej aktywności kinazowej.

Za udziałem mechanizmu autofosforylacji w poischemicznych zmianach aktywności i lokalizacji CaMKII przemawia fakt, że enzym po ischemii staje się oporny na fosforylację *in vitro*.

Inhibitor receptora/kanalu NMDA, MK801, osłabia indukowaną przez ischemię początkową fazę aktywacyjną jak i następującą po niej inhibicję CaMKII we wczesnej fazie niedokrwienia.

Brak selektywności w reakcji CaMKII na ischemię (kora przodomózgowia vs hipokamp) poddaje w wątpliwość przyczynowy udział tego enzymu w opóźnionej poischemicznej degeneracji neuronów hipokampa po 5 minutach ischemii u chomika mongolskiego.

KINAZA BIAŁKOWA ZALEŻNA OD WAPNIA I FOSFOLIPIDÓW (KINAZA BIAŁKOWA C, PKC)

WPROWADZENIE

Charakterystyka ogólna

Kinaza białkowa C (PKC; ATP: fosfotransferaza białkowa EC.2.7.1.37) należy do rodziny kinaz serynowo-treoninowych. Podobnie jak omówiona w poprzedniej części CaMKII, kinaza białkowa C jest enzymem wielofunkcyjnym, posiadającym zdolność fosforylowania wielu substratów. Liczne izoenzymy PKC obecne są właściwie w komórkach wszystkich tkanek (Nishizuka, 1988). Różnice lokalizacji poszczególnych izoenzymów PKC, jak i różne mechanizmy aktywacji, sugerują odmienne role funkcjonalne. Specyficzne funkcje fizjologiczne dotychczas poznanych izoenzymów PKC nie zostały wyjaśnione. Wiadomo jednak, że są one włączone w procesy o podstawowym znaczeniu dla komórki, takie jak wzrost i różnicowanie (Kikkawa i wsp., 1989; Ohno i wsp., 1991; Hofmann, 1997).

Przedmiotem niniejszej pracy jest podklasa izoenzymów tzw. konwencjonalnych, cPKC, czyli aktywowanych w obecności wapnia i fosfolipidów. Izoenzymy tej klasy α , $\beta_{1,2}$ oraz γ występują w ośrodkowym układzie nerwowym, aczkolwiek jedynie forma γ jest izoenzymem specyficznym dla mózgu i rdzenia kręgowego.

Struktura molekularna

Badania molekularne wskazują na obecność 11 izoenzymów, różniących się strukturą pierwszorzędową i będących produktami różnych genów (Azzi, 1992; Goldberg, Steinberg, 1996; Hofmann, 1997). Izoenzymy PKC na podstawie różnic

strukturalnych (domen C1 i C4) i regulacji przez kofaktory sklasyfikowano w 3 grupach (Nishizuka, 1995; Hofman, 1997; Goldberg, Steinberg, 1966).

Najlepiej scharakteryzowaną grupę enzymów stanowi klasa tak zwanych konwencjonalnych wapniowo-zależnych kinaz (cPKC), obejmujących izoformę α , dwa warianty β (1 i 2) oraz γ . Izoenzymy PKC są pojedynczymi peptydami, o ciężarze około 80 kDa, zawierającymi cztery konserwatywne domeny funkcjonalne (C1-C4) i oddzielające je domeny zmienne (V1-V5) których funkcja jeszcze nie jest poznana. Odcinki polipeptydowe od końca C (C3-V5) zostały zdefiniowane jako domeny katalityczne, oddzielone od N końcowej domeny regulatorowej fragmentem V3. Domena katalityczna c PKC, podobnie jak CaMKII, zawiera sekwencję aminokwasów stanowiącą autoinhibycyjny pseudosubstrat (fragment V1), którego rolą jest supresja kinazy C w stanie niepobudzonym.

Domeny regulatorową i katalityczną można oddzielić przez ograniczoną degradację proteolityczną za pomocą trypsyny (Huang, Huang, 1986; Newton, Koshland, 1989) lub wapniowo-zależnej proteazy - kalpiny (Kishimoto i wsp., 1983). Katalityczny fragment PKC nazwany oryginalnie PKM, jest polipeptydem o ciężarze 44-55 kDa. Fragment regulatorowy (32-36 kDa) wiąże kofaktory (wapń, fosfolipidy, DAG), które indukują zmiany konformacyjne, pozwalające na interakcje domeny katalitycznej z substratem. Miejsce wiązania DAG i estrów forbolu zidentyfikowano na bogatej w cysteinę domenie C1, poprzedzonej autoinhibycyjną sekwencją pseudosubstratową. Na domenie C2 znajduje się miejsce rozpoznające kwaśne lipidy i miejsce wiązania Ca^{2+} . Natomiast sekwencje aminokwasowe domen C3 i C4 są miejscem wiążącym ATP i substrat.

Podobną budową molekularną, za wyjątkiem braku miejsca wiążącego wapń, charakteryzują się izoenzymy δ , ϵ , η , τ i μ zaliczane do nowej grupy nPKC. Izoenzymy cPKC i nPKC można traktować jako wewnątrzkomórkowe receptory dla DAG i estrów forbolu. Ostatnią grupę izoform kinazy C stanowią kinazy atypowe, aPKC (λ i ζ), w znacznym stopniu różniące się od enzymów klasy cPKC i nPKC.

Izoenzymy tej klasy nie odpowiadają na stymulacje estrami forbolu i nie wymagają obecności wapnia (Nishizuka, 1995). Mechanizm aktywacji tych izoform *in vivo* pozostaje niejasny, jakkolwiek badania *in vitro* wykazały specyficzną stymulację aktywności przez PIP_3 (Nakanishi, 1993).

Regulacja aktywności

Fizjologiczna aktywacja izoenzymów cPKC polega na przyłączeniu diacyloglicerolu (DAG), działającego w połączeniu z fosfolipidami (fosfatydyloseryną) i Ca^{2+} . Prowadzi to do zmiany konformacji enzymu i uwolnienia katalitycznej części od blokady przez pseudosubstrat (Kemp i wsp., 1989). Zastąpienie DAG estrami forbolu, wiążącymi się z regulatorową domeną enzymu, prowadzi również do fizjologicznej aktywacji kinaz (Nishizuka, 1992, 1995).

Podstawowy mechanizm aktywacji jest równoznaczny z przeniesieniem cząsteczki enzymu do błon, gdzie znajdują się lipidowe aktywatory oraz większość swoistych substratów (Kikkawa, 1989; Bazzi, Nelsestuen, 1991; Oancea i wsp., 1998). Klasyczne izoformy PKC wydają się być translokowane głównie do błon plazmatycznych, gdzie w odpowiedzi na pobudzenie receptorowe przejściowo wzrasta stężenie jonów i aktywatorów kinaz białkowych.

Jak już wspomniano, klasyczna kinaza białkowa C jest enzymem aktywowanym przez Ca^{2+} i DAG, powstający w wyniku zależnej od aktywacji receptorów hydrolizy fosfolipidów inozytolowych. Taka hydroliza jest powszechnym mechanizmem przekazywania sygnału z różnych receptorów błonowych do wnętrza komórek. Produktem degradacji 4,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu w wyniku działania fosfolipazy C jest DAG oraz 1,4,5-trisfosforan inozytolu (IP_3), który jest mediatorem uwalniania wapnia z jego wewnątrzkomórkowych magazynów. Ta droga aktywacji PKC jest równoznaczna z włączeniem enzymu w szlak transdukcji sygnału, powstający po pobudzeniu receptorów związanych z aktywacją zależnej od białek G formy β

fosfolipazy C (β PLC) (Hug, Sarre, 1993). Drugą drogą aktywacji PKC jest pobudzenie receptorów związanych z γ PLC np. przez czynniki wzrostowe (Lee, Rhee, 1995).

Niektórzy badacze postulują, że oprócz kofaktorów dla pełnej aktywności PKC wymagana jest także fosforylacja enzymu (Patel, Stabel, 1989; Flindt i wsp, 1990; Dutil i wsp, 1994). Kinaza białkowa C ma być syntetyzowana jako nieaktywny defosforylowany prekursor 74 kDa (Borner i wsp., 1989) a następnie ulegać fosforylacji przez jeszcze nie zdefiniowany enzym. Proces fosforylacji ma prawdopodobnie regulować subkomórkową lokalizację enzymu (Yavin, Insete-Igual, 1995).

Ważnym mechanizmem regulującym aktywność PKC jest ograniczona proteoliza cząsteczki enzymu przy udziale Ca^{2+} -zależnych proteaz, kalpain. Produktem tej degradacji jest katalityczna podjednostka, zwana kinazą białkową M (PKM), która jest wyłączona spod kontroli regulatorów aktywności (Kishimoto i wsp., 1983; Kikkawa i wsp., 1989). Przez wiele lat proces ten obserwowany był jedynie w układach *in vitro* (Al, Cohen, 1993; Pontremoli i wsp., 1990; Shea i wsp., 1994, 1995, 1996). Bardzo niski, często na granicy detekcji, poziom PKM w warunkach fizjologicznych stawia pod znakiem zapytania znaczenie tej formy proteolitycznej. Dotychczas nie wiadomo, czy wogóle dochodzi do jej powstania, czy też wygenerowana PKM ulega natychmiastowej degradacji, co uniemożliwia jej identyfikację. W zgodzie z tym drugim przypuszczeniem pozostają wyniki badań wskazujące, że PKM jest szybciej niż PKC degradowana przez kalpainę (Shea i wsp., 1994). Wyraźny przyrost kinazy białkowej M w hipokampie mózgu obserwowano natomiast *ex vivo* po ischemii odwracalnej (Domańska-Janik, Zabłocka, 1993) i w chorobach neurodegeneracyjnych (Nixon 1989; Saith, Masliah, 1993). Teoretycznie PKM może fosforylować inne dodatkowe klasy substratów, nie osiągalnych dla związanych z błonami i zależnych od kofaktorów enzymów macierzystych.

Kinaza białkowa C w ośrodkowym układzie nerwowym

Rozmieszczenie cPKC w ośrodkowym układzie nerwowym jest niejednolite i odmienne dla poszczególnych izoform. Najwyższe stężenie izoformy γ , specyficznej dla układu nerwowego, znaleziono w hipokampie, korze mózgu i rdzeniu kręgowym (Kitano i wsp., 1987; Nishizuka, 1988). Wysokie stężenia cPKC w rejonach zakończeń synaptycznych i ich otoczeniu (Gajkowska i wsp., 1994) sugerują zaangażowanie kinazy w procesy przenoszenia informacji przez synapsę.

Specyficznym substratem PKC, zlokalizowanym w części presynaptycznej, jest białko GAP-43 (ang. growth associated protein) zwane inaczej białkiem B-50 lub neuromoduliną (Gispen i wsp., 1985), zaangażowane w regulację uwalniania noradrenaliny z zakończeń nerwowych (De Graan i wsp., 1991) oraz w presynaptyczne uwalnianie neuroprzekazników podczas długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) (Leahy i wsp., 1993). Specyficznym substratem cPKC, zlokalizowanym zarówno post jak i presynaptycznie, jest białko MARCKS (ang. myristoylated alanine-rich C kinase substrate). Fosforylacja MARCKS jest obserwowana natychmiast po aktywacji komórek, co sugeruje wspólną lokalizację PKC i substratu w miejscu błony wiążącym swoiście MARCKS i aktywną kinazę C (Rosen i wsp., 1990; Burns, Bell, 1992). Znanym postsynaptycznym substratem PKC jest neurogranina, której fosforylację obserwuje się podczas pobudzenia receptorów NMDA i w LTP (Rodriquez-Sanchez i wsp., 1997; Chen i wsp., 1997).

Dotychczasowe badania *in vitro* i *in vivo* wskazują, że izoenzymy cPKC mogą pełnić rolę w procesach prowadzących do śmierci neuronów po niedokrwieniu mózgu (Cardell i wsp., 1990; Wieloch i wsp., 1991; Domańska, Zalewska, 1992; Cardell, Wieloch, 1993; Busto i wsp., 1994; Murphy i wsp., 1994; Zabłocka i wsp., 1994). Szybka utrata aktywności neuronalnej cPKC występowała przed pierwszymi morfologicznymi oznakami śmierci neuronów indukowanej aminokwasami pobudzającymi (Durkin i wsp., 1996, 1997). Za rolę kinaz w niedokrwieniu przemawiają, tak jak w przypadku CaMKII, wyniki zastosowania hipotermii, która jest czynnikiem chroniącym komórki

przed śmiercią oraz hamuje inaktywację PKC (Churn i wsp.,1990; Cardell i wsp.,1991). Według istniejących hipotez PKC jest łącznikiem wiążącym krótkotrwałe reakcje zainicjowane przez neurotransmisję pobudzającą z wystąpieniem zmian czynników transkrypcyjnych i ekspresji genów tzw. wtórnych. Tak więc, spowodowane ischemią zmiany stopnia fosforylacji wielu zasadniczych dla prawidłowego funkcjonowania komórki substratów cPKC mogą na różnych poziomach zaburzyć zasadnicze dla przeżycia funkcje neuronów.

MATERIAŁ I METODY

1. Materiał doświadczalny

Badania kinazy białkowej C, analogicznie jak opisane wcześniej badania CaMKII, prowadzono na szczurach rasy Wistar i chomikach mongolskich.

2. Modele niedokrwienia

2.1. Model ischemii podekapitacyjnej u szczurów. Szczury dekapitowano i głowy inkubowano w temperaturze 37°C przez okres czasu zaznaczony w opisie poszczególnych doświadczeń.

2.2. Niedokrwienie odwracalne u chomika mongolskiego. Sposób postępowania zamieszczony został w rozdziale Materiał i Metody (str.13) w części poświęconej CaMKII.

3. Przygotowanie tkanki do oznaczenia aktywności cPKC

Wyizolowane struktury mózgu (kora przodomózgowia i hipokamp) homogenizowano (w stosunku 1:20) w buforze A o składzie: 10 mM Tris (pH 7.5), 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA i 0.2 mM PMSF. Homogenaty tkanki w buforze A wirowano w 50,000 g przez 10 minut. Zebrane supernatanty (frakcja cytosolowa) nanoszono bezpośrednio na kolumnę jonowymienną (0.5 x 1 cm), wypełnioną celulozą DE-52. Otrzymane w wyniku wirowania osady (frakcja błonowa) przed nałożeniem na kolumnę solubilizowano 0.5% Tritonem X 100 w buforze A (30 min przy temp. 0°C, vortex) i ponownie wirowano przy wyżej podanych parametrach. Tak przygotowane supernatanty rozdzielano na kolumnie DE-52 celulozowej. Kinazę białkową C eluowano 0.15 M NaCl w buforze A. Aktywność kinazową oznaczano we frakcjach o najwyższej zawartości białka.

4. Oznaczanie aktywności cPKC

Aktywność cPKC mierzono szybkością przeniesienia znakowanych [^{32}P] reszt fosforanowych z γATP na specyficzny substrat - histon IIA i wyrażano w jednostkach przedstawiających ilość pmoli [$^{32}\text{PO}_4$] $^{-3}$ przyłączonych do substratu w ciągu 1 minuty. Radioaktywność prób oznaczano w liczniku scyntylacyjnym Beckman LS 9000.

5. Wiązanie [^3H]PDBu do błon

Frakcję błon otrzymywano na drodze wirowania homogenatu mózgu szczura (50,000 g przez 10 minut) przygotowanego w roztworze 20 mM Trisu (pH 7.5) zawierającym 0.2 mM PMSF. Obecność w roztworze 0.5 mM EGTA i 2 mM EDTA zaznaczono w opisie rycin. Błony inkubowano z różnymi stężeniami (2.5-50 nM) [^3H]PDBu. Wiązanie niespecyficzne oznaczano w obecności 1 μM PDBu nie znakowanego. Radioaktywność wiązania niespecyficznego wynosiła mniej niż 10% całkowitego wiązania w badanej próbce.

6. Analiza immunochemiczna

Poziom białka cPKC oceniano metodą Western blot. Reakcję immunochemiczną z przeciwciałami specyficznymi dla poszczególnych izoform cPKC uwidaczniano metodą chemiluminescencji. Natężenie immunoreaktywności oceniano przy użyciu densytometrii ilościowej. W badaniach stosowano przeciwciało monoklonalne specyficzne dla izoform α i β_1 PKC (f-my Amersham) i przeciwciało poliklonalne dla izoformy γ PKC (Gibco BRL).

7. Inne procedury

7.1. Oznaczanie białka

Zawartość białka określano metodą Lowry i wsp.(1951) lub metodą Bradford (1976).

7.2. Analiza statystyczna.

Analizę statystyczną przeprowadzono zgodnie z opisem zawartym w rozdziale Materiał i Metody w części dotyczącej CaMKII (str.16).

WYNIKI

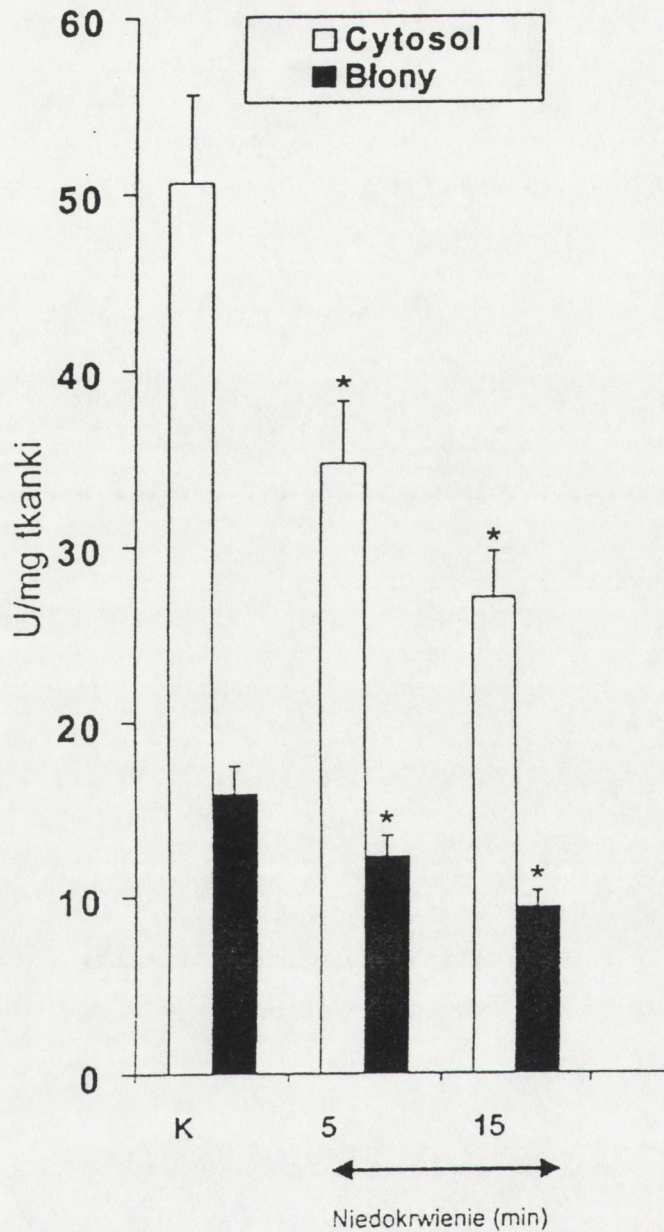
1. Wpływ nieodwracalnego niedokrwienia na aktywność cPKC w subkomórkowych frakcjach mózgu szczura

1.1. Aktywność enzymatyczna i poziom białka cPKC

Celem podjętych badań była ocena wpływu ostrego niedokrwienia (ischemia podekapitacyjna) na modulację zależnej od wapnia i fosfolipidów katalitycznej aktywności kinazy białkowej (PKC) w cytosolu i we frakcji błon plazmatycznych. Uzyskane wyniki wskazują na znaczące, zależne od czasu niedokrwienia, obniżenie całkowitej aktywności enzymu, przy zachowaniu stałej proporcji puli aktywności rozpuszczalnej i związanej z błonami (ryc. 8). Już po 5 minutach ischemii poziom aktywności był niższy od kontrolnego o 30%. Przedłużenie czasu niedokrwienia do 15 minut powodowało dalszy, 10%-owy spadek aktywności katalitycznej PKC.

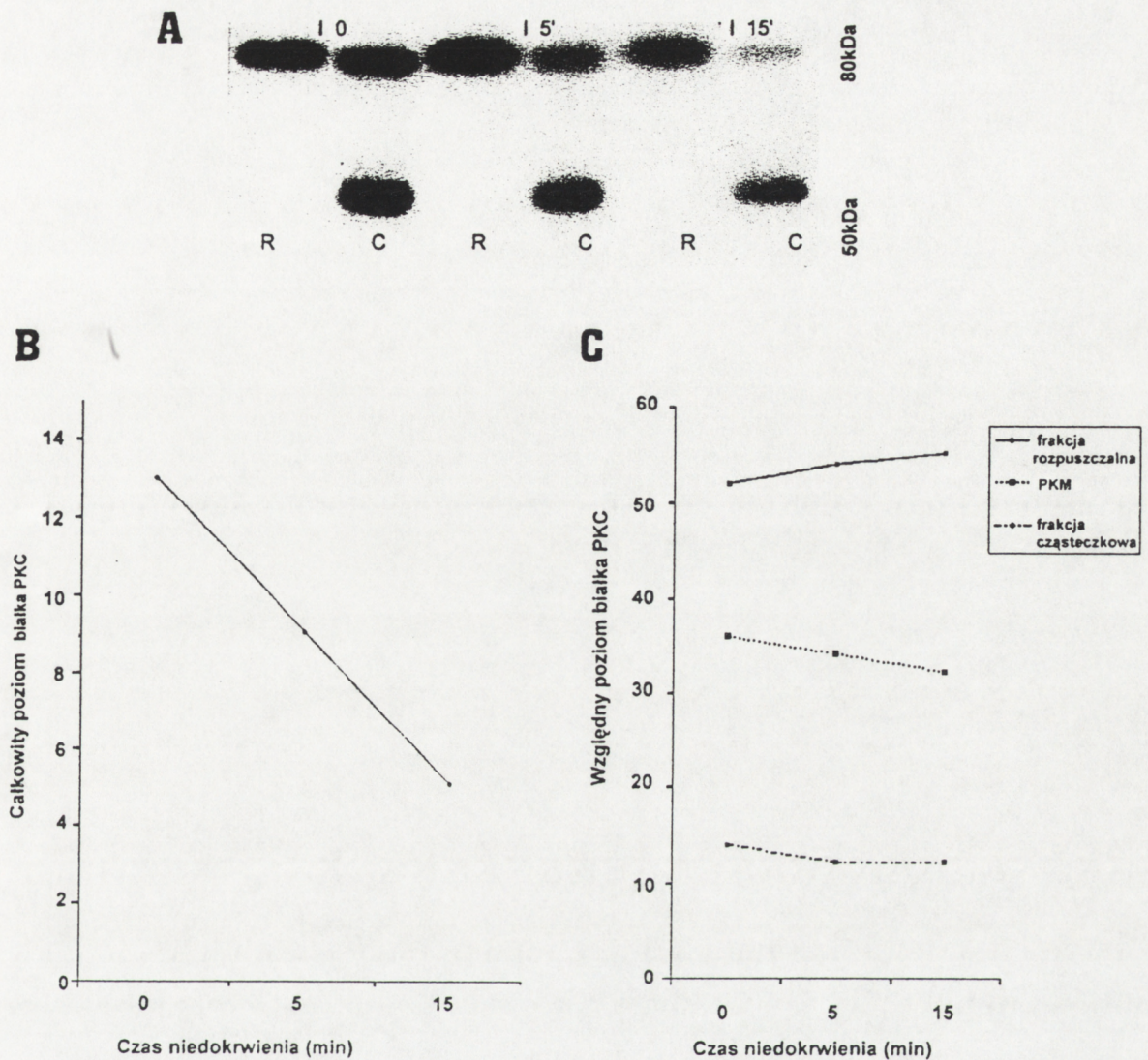
Obniżeniu aktywności enzymu towarzyszy równoległy spadek poziomu białka cPKC w homogenacie (do 40% wartości kontrolnej po 15 minutach niedokrwienia), bez znamiennych zmian lokalizacji subkomórkowej (ryc. 9). Ischemia podekapitacyjna prowadzi także do obniżenia poziomu związanej z frakcją cząsteczkową kinazy białkowej M (50 kDa), powstającej w wyniku proteolitycznego rozpadu kinazy białkowej C.

Szersze omówienie wpływu niedokrwienia na proteolizę PKC i powstawanie PKM zamieszczone jest w dalszej części prezentowanej pracy, dotyczącej wapniowo-zależnych proteaz - kalpain (pkt. 2.4.2. str. 84).



Ryc. 8. Wpływ ischemii podekapitacyjnej na aktywność enzymatyczną cPKC w mózgu szczura

Aktywność cPKC oznaczano w eluatach 0.15M NaCl otrzymanych na drodze chromatograficznego rozdziału frakcji cytosolowej i błonowej mózgu zwierzęcia kontrolnego i poddanego ischemii. Aktywność wyrażono w jednostkach (pmole $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ /minutę) podanych na mokrą masę tkanki. Każda wartość jest średnią \pm SD uzyskaną w wyniku analizy czterech zwierząt przy trzech powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej są zaznaczone * $P < 0.002$



Ryc. 9. Wpływ ischemii podekapitacyjnej na poziom i lokalizację subkomórkową białka cPKC w mózgu szczura.

A) Reprezentatywny Western blot przedstawia immunoreaktywność białka cPKC po ischemii dekapitacyjnej (trwającej 0-15min). Reakcję immunochemiczną we frakcjach: rozpuszczalnej (R) i cząsteczkowej (C) homogenatów mózgu szczura prowadzono przy użyciu przeciwciała specyficznego dla cPKC $\alpha + \beta_1$. Zaznaczono pozycję PKC (80 kDa) i PKM (50 kDa). Wykresy przedstawiają poziom białka cPKC w homogenacie (B) i w badanych frakcjach subkomórkowych (C). Wartości zamieszczone na wykresach uzyskano za pomocą ilościowej densytometrii wykonanych immunoblotów. Całkowity poziom białka cPKC w homogenacie wyrażono jako wartości gęstości optycznej densytometrowanych blotów (B). Poziomy białka cPKC we frakcjach (cząsteczkowej i rozpuszczalnej) oraz poziom PKM wyrażono w wartościach względnych, w stosunku do przyjętego za 100% poziomu cPKC w homogenacie (C). Zaznaczone punkty są średnimi uzyskanymi w wyniku analizy trzech zwierząt.

Ischemia całkowita prowadzi do obniżenia całkowitej aktywności enzymatycznej i poziomu białka cPKC bez zmian dystrybucji pomiędzy cytosolem i frakcją błonową.

1.2. Oznaczenie ilości cPKC przez wiązanie estru forbolu (PDBu)

Celem dodatkowego sprawdzenia, czy obniżenie aktywności katalitycznej cPKC wiąże się z degradacją białka enzymatycznego, wykorzystano zdolność specyficznego wiązania radioaktywnego ligandu, jakim jest ester forbolu - $[^3\text{H}]$ PDBu, do regulatorowej domeny cząsteczki kinazy białkowej C. Tę część badań wykonano na frakcji błon, przygotowanej zgodnie z opisem tabeli 3.

Tabela 3. Wpływ 15 minutowej ischemii podekapitacyjnej na wiązanie $[^3\text{H}]$ PDBu do błon mózgu szczura

Rodzaj preparatyki	B_{max} (pmole/mg białka)	K_D (nM)
A		
Kontrola	16.2 ± 1.7	15.0 ± 2.5
Ischemia	$11.3 \pm 1.7^*$	$10.5 \pm 1.14^*$
B		
Kontrola	2.8 ± 0.32	7.5 ± 1.81
Ischemia	2.5 ± 0.30	5.9 ± 1.76
C		
Kontrola	6.8 ± 0.31	5.5 ± 0.61
Ischemia	7.1 ± 0.48	5.6 ± 0.92

Wartości prezentowane w tabeli są średnimi arytmetycznymi \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów przy trzech powtórzeniach każdego oznaczenia.

Błony przygotowane wg opisanych niżej procedur różnią się wartościami K_D i B_{max} . Znamienne statystyczne różnice występują zarówno w grupach kontrolnych jak i ischemicznych. ($p < 0.001$)

Frakcje błon otrzymane wg procedury opisanej w rozdziale Materiał i Metody przemywano samym buforem Tris (pH 7.4) lub buforem z dodatkiem związków chelatujących i /lub Ca^{2+} wg podanego niżej wzoru: A. Błony przygotowane i przemywane buforem Tris (pH 7.4), B. Błony przemywane trzykrotnie buforem Tris zawierającym 2 mM EDTA i 0.5 mM EGTA, C. Błony przygotowane tak jak w punkcie B ale wiązanie PDBu prowadzone w obecności Ca^{2+} . Wartości specyficznego wiązania $[^3\text{H}]$ PDBu (średnie \pm SEM) wyrażone ilością cpm na próbkę $\times 10^3$ przy stężeniu ligandu 25 nM wynosiły: dla błon przygotowanych metodą A 10.90 ± 0.42 dla kontroli i 8.72 ± 0.48 dla ischemii; metodą B odpowiednio 2.56 ± 0.08 i 2.47 ± 0.05 i metodą C 5.97 ± 0.48 i 5.32 ± 0.22 . Znamienne statystyczne różnice w stosunku do odpowiednich kontroli są zaznaczone $*p < 0.05$.

Analiza wyników (Tab. 3) wskazuje na redukcję wiązania PDBu (do 70% wartości kontrolnych), proporcjonalną do opisanego wyżej obniżenia fosforylacyjnej aktywności enzymu w błonach izolowanych z mózgów poddanych ischemii (porównaj ryc. 8 i Tab. 3 A). Ekstrakcja błon w obecności chelatorów wapnia (EDTA/EGTA) znosiła różnice w wiązaniu forbolu przez błony z mózgu zwierząt kontrolnych i ischemicznych. Ponadto obserwuje się równoczesny wzrost powinowactwa ligandu do wiązania przez błony plazmatyczne mózgu zwierząt po ischemii.

Zastosowanie metody wiązania ligandu specyficznego dla regulatorowej domeny cząsteczki PKC wskazuje na indukowane przez 15 minutową ischemię obniżenie ilości cPKC znajdującej się w puli enzymu luźno związanego z błonami plazmatycznymi. Trwale związana z błonami frakcja PKC (niewrażliwa na chelatory) nie ulega zmianom w warunkach niedokrwienia.

Zmiana powinowactwa wiązania forbolu do błon poischemicznych może wskazywać na niezidentyfikowane różnice, występujące w strukturze lub lokalizacji enzymu w błonie.

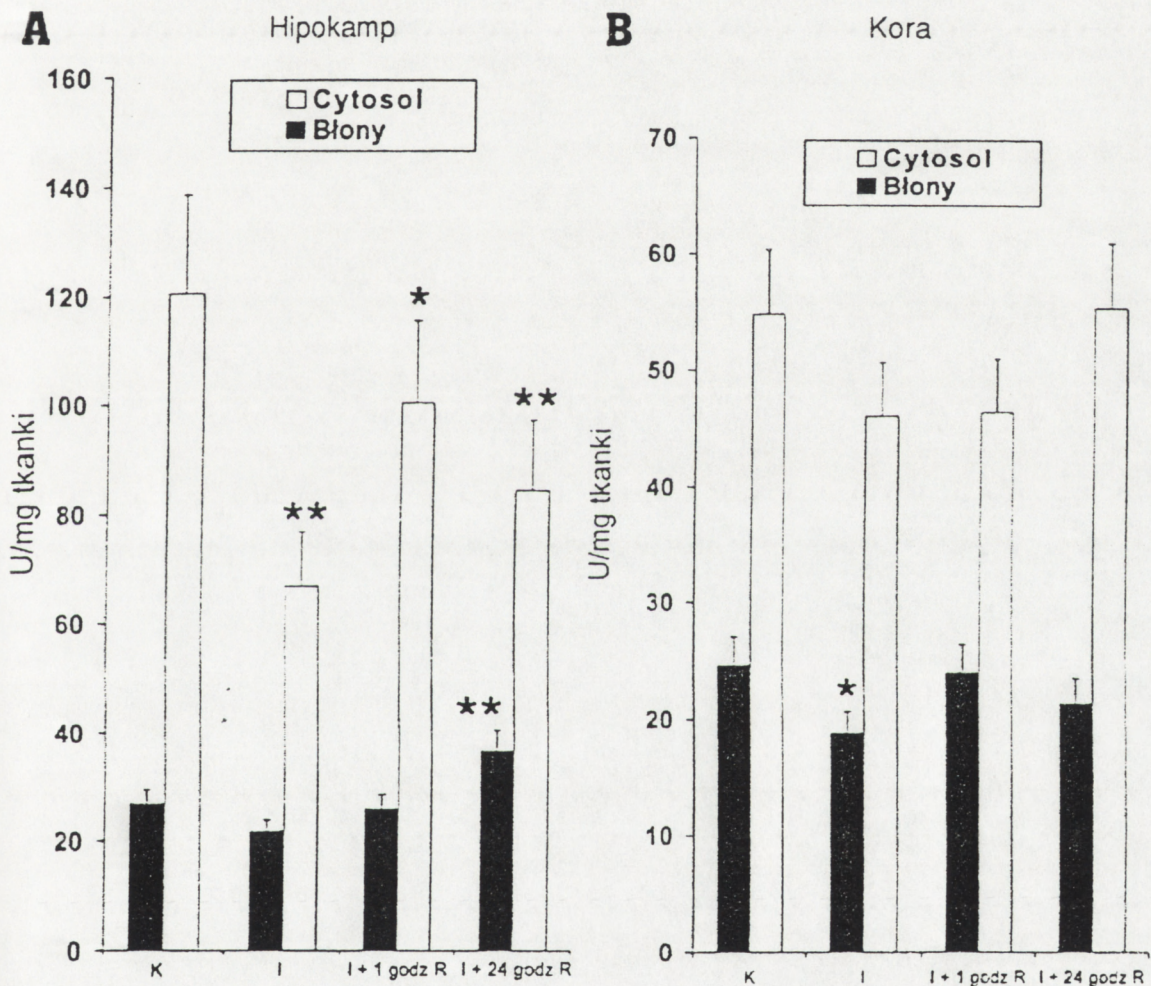
2. Wpływ odwracalnego niedokrwienia i reperfuzji na aktywność i subkomórkową lokalizację cPKC w mózgu chomika mongolskiego

2.1. Aktywność cPKC

Celem pracy było określenie wpływu niedokrwienia, indukowanego obustronnym zaciśnięciem tętnic szyjnych wspólnych u chomika mongolskiego, na zachowanie cPKC w korze przodomózgowia i hipokampie. Wyniki wskazują na znaczące, sięgające 40%, obniżenie aktywności fosforylacyjnej we frakcji cytosolowej hipokampa mózgu (ryc. 10 A). Zmiany dotyczące frakcji błonowej hipokampa manifestowały się jedynie nieznacznym wzrostem aktywności po 24 godzinach reperfuzji. W tym czasie rośnie także stosunek aktywności cPKC we frakcji błon do aktywności całkowitej osiągając wartość 162% kontroli. Wzrost tej proporcji jest już

widoczny bezpośrednio po epizodzie niedokrwinnym i utrzymuje się na tym samym poziomie po 1 godzinie reperfuzji (Tab.4).

Aktywność fosforylacyjna cPKC w korze przodomózgowia pozostaje na poziomie kontrolnym przez cały okres reperfuzji po niedokrwieniu. Jedyna zmiana obserwowana w tej strukturze dotyczyła znamiennego, krótkotrwałego obniżenia aktywności bezpośrednio po ischemii (ryc.10 B).



Ryc. 10. Wpływ niedokrwienia i reperfuzji na aktywność cPKC w wybranych strukturach mózgu chomika mongolskiego.

Wartości są średnimi arytmetycznymi \pm SD [jednostek (U) wyrażonych w pmołach $(^{32}\text{PO}_4)^{-3}$ na miligram mokrej masy] uzyskanymi w wyniku analizy 4-5 zwierząt w każdej grupie doświadczalnej. Każde z oznaczeń powtarzano trzykrotnie.

Znamienne różnice w stosunku do kontroli są zaznaczone ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

K- kontrola ; I- niedokrwienie; R- reperfuzja.

Tabela 4. Stosunek aktywności cPKC w błonach do aktywności całkowitej w wybranych strukturach mózgu

	Hipokamp	Kora
	B/B+C	B/B+C
Kontrola	0.21	0.30
Ischemia	0.26	0.28
Ischemia + reperfuzja 1 godz	0.26	0.29
Ischemia + reperfuzja 24 godz	0.34	0.27

Dane zamieszczone w tabeli obliczono na podstawie wartości aktywności enzymatycznej cPKC (ryc.10).

B - aktywność cPKC w błonach; B+C - aktywność całkowita cPKC

Dominującą zmianą, zaobserwowaną w okresie reperfuzji po 5 minutowej ischemii przodomózgowia u chomika mongolskiego, jest ograniczony do hipokampa spadek całkowitej aktywności fosforylacyjnej.

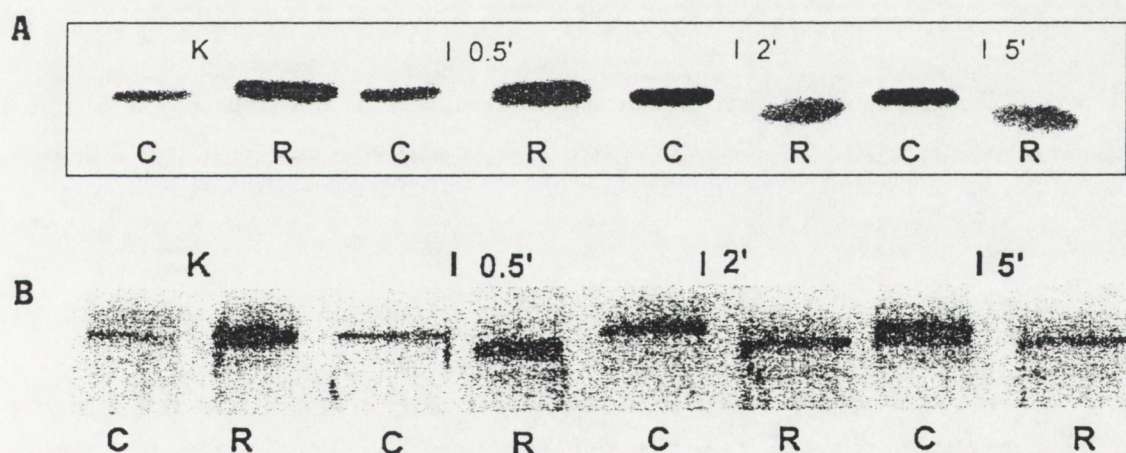
Względne zwiększenie aktywności PKC we frakcji błonowej może sugerować przemieszczanie kinazy w trakcie niedokrwienia.

2.2. Lokalizacja subkomórkowa białka cPKC określona metodą immunochemiczną

Mając na uwadze zaobserwowany wybiórczy charakter zmian aktywności fosforylacyjnej cPKC w badanym modelu odwracalnej ischemii mózgu, prześledzenie dynamiki zmian lokalizacji komórkowej białka enzymu ograniczono do hipokampa. Ilość białka izoform α/β oraz γ cPKC we frakcji rozpuszczalnej i cząsteczkowej określano używając ilościowego immunobarwienia. Rycina 11 przedstawia reprezentatywne immunobloty, demonstrujące poziom immunoreaktywności izoform:

α/β_2 (A) oraz γ cPKC (B) w badanych frakcjach w czasie ischemii. Znaczący przyrost ilości formy α/β cPKC we frakcji błon o 32%, z równoczesnym proporcjonalnym obniżeniem poziomu tej formy w cytosolu, widoczny jest po 2 minutach niedokrwienia i nie zmienia się do 5 minut (ryc.11 A i tab.5). Poziom izoformy γ już po 0.5 minutowej ischemii jest o 20% wyższy od kontroli i rośnie równolegle z wydłużeniem czasu niedokrwienia, osiągając po 5 minutach wartości dwukrotnie wyższe od wyjściowych (ryc.11 B i tab.5).

Na uwagę zasługuje fakt, że prążek immunoreaktywny we frakcji rozpuszczalnej wykazuje wyższą nieco ruchliwość elektroforetyczną (o około 2-5 kDa) od prążka frakcji błonowej (ryc.11). Występowanie formy enzymu o większej ruchliwości elektroferetycznej w cytosolu, mogłoby świadczyć o udziale fosforylacji enzymu w procesie przyłączania do błon plazmatycznych.



Ryc. 11. Wpływ niedokrwienia na immunoreaktywność cPKC w hipokampie mózgu chomika mongolskiego.

Reprezentatywne Western bloty przedstawiają immunoreaktywność białka izoformy α/β_2 (A) oraz γ cPKC (B) we frakcjach: cząsteczkowej (C) i rozpuszczalnej (R) hipokampa mózgu zwierząt kontrolnych i poddanych niedokrwieniu (0.5 - 5 minut). Reakcję prowadzono z przeciwciałem anti- α/β_2 i anti- γ cPKC i uwidaczniano metodą wzmocnionej chemiluminescencji. K- kontrola; I - ischemia.

Tabela 5. Zmiany poziomu białka alfa/beta i gamma cPKC we frakcji cząsteczkowej hipokampa w przebiegu niedokrwienia

	Izoformy cPKC	
	alfa/beta	gamma
Kontrola	31.1 ± 3.5	35.5 ± 2.5
Ischemia 0.5 min	29.7 ± 4.8	42.2 ± 3.4
Ischemia 2 min	41.3 ± 3.3	45.7 ± 2.0
ischemia 5 min	39.5 ± 4.6	66.1 ± 5.2

Wartości zamieszczone w tabeli uzyskano w wyniku ilościowej densytometrii Western blotów. Poziom białka izoform cPKC we frakcji cząsteczkowej wyrażono w wartościach względnych w odniesieniu do przyjętego za 100 % poziomu białka danej izoformy w homogenacie. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ± SD uzyskaną w wyniku analizy trzech zwierząt w każdej grupie eksperymentalnej, przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia.

Przemieszczenie badanych izoform cPKC z frakcji rozpuszczalnej do błon plazmatycznych w hipokampie mózgu jest jednym z wczesnych efektów niedokrwienia i wiąże się z dyskretną zmianą ruchliwości elektroforetycznej.

Translokacja specyficznej dla neuronów izoformy γ cPKC wydaje się nieco wyprzedzać reakcję poischemiczną izoform α/β .

W prezentowanej części badań opisano podstawowy wzorzec reakcji aktywności cPKC na czasowe ograniczenie dopływu krwi do mózgu. Wykazano że niedokrwienie, niezależnie od stopnia nasilenia, prowadzi w konsekwencji do znaczącego obniżenia aktywności fosforylacyjnej cPKC. W ischemii całkowitej (podekapitacyjnej) obok inhibicji aktywności kinazy, dotyczącej w równym stopniu frakcji rozpuszczalnej jak i cząsteczkowej, obserwuje się równoległe obniżenie ilości białka enzymu oraz wiązania estru forbolu (PDBu) do błon plazmatycznych mózgu szczura. Zniesienie tego typu odpowiedzi w błonach, izolowanych w obecności związków kompleksujących wapń, może wskazywać na ograniczenie procesu poischemicznej translokacji i inhibicji enzymu do frakcji kinazy luźno związanej z błoną.

Odwracalne niedokrwienie, o umiarkowanym stopniu nasilenia, obniża aktywność i zmienia dystrybucję wewnątrzkomórkową cPKC jedynie w hipokampie mózgu. Obserwuje się wyraźną tendencję do zachowania aktywności frakcji enzymu związanego z błoną. W rezultacie obliczony stosunek aktywności cPKC frakcji błon do aktywności całkowitej rośnie w porównaniu z kontrolą o 24% bezpośrednio po ischemii i o 62% po 24 godzinach reperfuzji. W tym czasie obserwuje się także wyraźne podwyższenie bezwzględnej aktywności enzymu związanego z błonami plazmatycznymi. Wyniki te wskazują pośrednio (na podstawie analogii z reakcją enzymu na aktywację forbolem *in vitro*) (Domańska, Zalewska, 1992) na przemieszczenie enzymu z frakcji rozpuszczalnej do cząsteczkowej zarówno w trakcie epizodu ischemicznego jak i w czasie reperfuzji. Zostało to potwierdzone badaniami immunochemicznymi w których wykazano, że zmiana wewnątrzkomórkowej dystrybucji cPKC występuje już po 0.5-2 minutach zablokowania dopływu krwi do mózgu. Jednocześnie wydaje się, że gwałtowna aktywacja PKC, związana z translokacją do błon, wyzwala nie w pełni poznany proces, ograniczający aktywność fosforylacyjną (ang. down-regulation).

Niektórzy z badaczy podkreślają, że niezbędnym warunkiem aktywności jest fosforylacja enzymu (Borner i wsp., 1989; Dutill i wsp., 1994; Yavin i wsp., 1995). Zaobserwowane przez nas różnice w ruchliwości immunoreaktywnego prążka we frakcji

błonowej i rozpuszczalnej mogą sugerować występowanie cyklu fosforylacji/defosforylacji, a więc aktywację enzymu we frakcji błonowej po ischemii.

Fenomen poaktywacyjnej inhibicji PKC jest równie daleki od wyjaśnienia. W wielu doniesieniach nie potwierdzono sugerowanego początkowo (Louis i wsp.1988) udziału proteolizy. Nie udało się zidentyfikować ani immunoreaktywnego fragmentu o ruchliwości elektroforetycznej odpowiadającej fragmentowi proteolitycznemu, czyli PKM, ani też nie stwierdzono wzrostu aktywności kinazowej niezależnej od wapnia (Kochhar i wsp., 1989; Crumrine i wsp.,1990; Louis i wsp.,1991; Domańska, Zalewska, 1992).

Natomiast równolegle prowadzone przez nas badania w układach bezkomórkowych wykazały zdolność wapniowo-zależnych proteaz - kalpain do proteolizy PKC. Wyniki tych eksperymentów przedstawione są w następnym rozdziale niniejszej pracy (ryc. 23 i 24, str. 85 i 86). Zastosowanie przeciwciała rozpoznającego sekwencję polipeptydu w obrębie podjednostki katalitycznej ujawniło przejściową obecność kinazy białkowej M, generowanej w wyniku aktywacji kalpain, która ulegała szybkiej dalszej proteolizie. Proteolityczny rozpad PKC, z przejściowym wzrostem PKM, widoczny był również we wczesnej fazie uszkodzenia poischemicznego (ryc. 25, str. 87) oraz w ischemii podekapitacyjnej (ryc. 9, str. 47). Kinaza M, podobnie jak we wspomnianych układach *in vitro*, pojawiała się przejściowo także w początkowym okresie reperfuzji (Domańska, Zabłocka, 1993).

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów nie możemy niestety określić, jaka część PKC ulega poischemicznej proteolizie, ponieważ nie mamy pewności, czy zastosowane przeciwciało prezentuje taki sam stopień powinowactwa do natywnego enzymu jak i do jego fragmentu proteolitycznego. Równolegle porównanie natężenia immunoreaktywności białka cPKC w homogenatach mózgu zwierząt poddanych ischemii odwracalnej nie wykazuje znaczących zmian po 5 minutach niedokrwienia. Jedynie u części tych zwierząt obserwowano spadek immunoreaktywności o 10-12%.

Mając na uwadze nieodwracalny charakter proteolitycznej modyfikacji cząsteczki enzymu można przypuszczać, że na początkowym etapie stresu ischemicznego ulega jej

jedynie znikoma część cPKC. Rozpad ten nasila się znacznie w czasie 15 minut całkowitego niedokrwienia w modelu podekapitacyjnym (ryc. 9). Opisany przez Domańską i Zabłocką (1993) wyraźny spadek poziomu białka cPKC obserwowano również w czasie 3 godzin reperfuzji po trwającej 5 minut ischemii u chomika mongolskiego, co może świadczyć o postępie procesu proteolitycznego już po przywróceniu krążenia w tym modelu doświadczalnym.

Podsumowanie: Stres ischemiczny indukuje dwie przeciwstawne reakcje ze strony klasycznych (wapniowo-zależnych) izoform PKC, których głębokość zależy od czasu i charakteru niedokrwienia. Początkowa aktywacja/translokacja kinazy białkowej C w kierunku błon plazmatycznych przechodzi w nasilającą się w czasie reperfuzji reakcję inhibicyjną, w której pewne znaczenie odgrywać mogą procesy proteolityczne.

PROTEAZY CYSTEINOWE ZALEŻNE OD WAPNIA - KALPAINY

WPROWADZENIE

Charakterystyka ogólna

Kalpainy (EC 3.4.22.17) są jednymi z ważniejszych proteaz wewnątrzkomórkowych, obecnych we wszystkich badanych komórkach zwierzęcych. Scharakteryzowane pierwotnie jako aktywowane wapniem obojętne proteazy cysteinowe, należą do rodziny cytosolowych proteaz tiolowych. Wszystkie badane komórki ssaków zawierają 1 lub 2 najważniejsze tzw. konwencjonalne izoenzymy kalpain: μ -kalpainę nazywaną też kalpainą I i/lub m-kalpainę, tzw kalpainę II. Oprócz form konwencjonalnych zidentyfikowano także kalpainy specyficzne tkankowo, tj kalpaina p94 lub nCL-1 zlokalizowana w mięśniach szkieletowych i kalpaina nCL-2 w żołądku. Proteazy te odpowiadają prawdopodobnie za funkcje specyficzne dla danej tkanki (Sorimachi i wsp., 1997). Liczne tzw. "atypowe" homologi kalpain znaleziono w organizmach niższych: insektach, grzybach i drożdżach. Zawierają one homologiczne domeny proteazowe, tworząc grupę różniącą się od innych proteaz cysteinowych, takich jak kaspazy, papainy czy katepsyny (Berti, Storer, 1995), co wskazuje na ewolucyjne zachowanie funkcji proteaz.

Nasza wiedza, dotycząca enzymologicznych i biologicznych własności kalpain, odnosi się do najbardziej rozpowszechnionych izoform konwencjonalnych, jakimi są μ - i m-kalpaina. Różnią się one stężeniami wapnia, wymaganymi dla ich aktywacji w układach *in vitro*: μ -kalpaina wymaga mikromolarnych stężeń wapnia, natomiast m-kalpaina stężeń milimolarnych. Jakkolwiek własności strukturalne i enzymatyczne kalpain są dobrze scharakteryzowane, ich funkcja fizjologiczna nadal nie jest wyjaśniona. Ścisła zależność aktywności katalitycznej od obecności jonu wapnia sugeruje udział kalpain w licznych wapniowo-zależnych procesach komórkowych. Nie znana jest

specyficzność substratowa kalpain. Proponowano co prawda sekwencję PEST (sekwencja aminokwasów obejmująca prolinę, kwas glutaminowy, asparaginowy, serynę i treoninę) jako sekwencję specyficzną, rozpoznawaną przez kalpainę (Rogers i wsp., 1986; Wang i wsp., 1989). Po znalezieniu, że mutacja tej sekwencji nie zmienia wrażliwości na proteolizę, jej specyfika stała się raczej wątpliwa. Przypusza się, że substratami kalpain mają być białka wiążące kalmodulinę (Wang i wsp., 1989; Molinari i wsp., 1995).

Aktywacja kalpain prowadzi do nieodwracalnego, proteolitycznego rozpadu białek substratowych. Jak wykazały badania *in vitro*, kalpains rozszczepiają ograniczoną ilość specyficznych miejsc w białkach natywnych, prowadząc do powstania raczej dużych fragmentów polipeptydowych aniżeli drobnych peptydów czy aminokwasów. Tym niemniej, taka ograniczona proteoliza białek może spowodować destabilizację struktury i zwiększyć podatność na działanie innych proteaz komórkowych (Saido i wsp., 1994).

W przypadku niektórych enzymów proteoliza prowadzi do powstania aktywnych form, nie wymagających odwracalnych czynników aktywujących, takich jak wapń czy fosfolipidy (Kishimoto i wsp., 1989). Konsekwencje fizjologiczne aktywacji kalpain są określane poprzez następstwa modyfikacji proteolitycznej licznych substratów.

Struktura molekularna

Kalpains konwencjonalne (μ i m) składają się z dużej 80 kDa podjednostki katalitycznej i identycznej dla obu izoform małej 28 kDa podjednostki regulatorowej, będącej produktem pojedynczego genu (Kawasaki i wsp., 1986). Podjednostki katalityczne obu izoform są natomiast produktami różnych genów i dzielą 50-60% homologii. Obie podjednostki: 80 kDa i 28 kDa zawierają w rejonie końca karboksylowego domeny kalmodulino-podobne, które funkcjonują jako receptory wapnia (domena IV i VI). Duża podjednostka zawiera jeszcze domenę katalityczną (II domena), homologiczną do innych proteinaz cysteinowych. Nie znane są natomiast

funkcje domen I i III. Rejon końca aminowego małej podjednostki (domena V) posiada liczne reszty glicynowe i ma charakter hydrofobowy. Jest to miejsce wiązania fosfolipidów (Imajoh i wsp., 1986; Arthur, Crawford, 1996). Obie podjednostki w cząsteczce natywnego enzymu są związane niekowalencyjnie w rejonach C końca (domeny kalmodulino-podobne) (Suzuki i wsp., 1987).

Mechanizmy regulacji kalpain

Dotychczas nie został wyjaśniony w sposób jednoznaczny mechanizm aktywacji kalpain *in vivo*, uwzględniający rozbieżności pomiędzy stężeniami wapnia wymaganymi dla aktywacji enzymów *in vitro* (stężenia mikromolarne dla μ - i milimolarne dla m-kalpainy) i wewnątrzkomórkowym, poniżej progu aktywacji kalpain, stężeniem tego jonu. Do chwili obecnej akceptuje się opracowaną równocześnie przez Mellgrena (1987) i Suzuki (Suzuki i wsp., 1987) teorię aktywacji błonowej. Zakłada ona, że kalpainsy natywne są proenzymami, które ulegają aktywacji poprzez autoproteolizę na błonach plazmatycznych w warunkach wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Autoliza enzymu generuje aktywną 76 kDa formę proteazy o wyższym (10 do 20 razy), aniżeli forma natywna, powinowactwie do wapnia. Taki aktywny enzym jest już zdolny do proteolizy białkowych substratów błonowych a po uwolnieniu do frakcji cytosolowej także substratów rozpuszczalnych. Aktywna forma enzymu istnieje tylko przejściowo, ulegając dalszej autolizie i inaktywacji.

Inna z hipotez zakłada bliżej nie zdefiniowany, odwracalny mechanizm aktywacji kalpainsy, oparty na translokacji do błon ale wykluczający autolizę (Molinari i wsp., 1994). Kalpaina zatem mogłaby wracać do stanu "proenzymu" po oddysocjowaniu z błon, w wyniku powrotu stężenia wapnia do poziomów fizjologicznych.

Modyfikacji proteolitycznej nie wymaga także ostatnio opisany tzw. dysocjacyjny mechanizm aktywacji kalpain w układach *in vitro* (Yoshizawa i wsp., 1995). Zakłada on, że w obecności jonów wapnia dochodzi do dysocjacji kalpainsy do podjednostek. Oddysocjowana podjednostka katalityczna 80 kDa jest w pełni aktywna enzymatycznie i

wykazuje identyczne jak forma autolityczna powinowactwo do wapnia. Z drugiej strony spekuluje się, że dysocjacja może być jedynie konsekwencją autolizy.

Żaden z omówionych wyżej mechanizmów nie tłumaczy, jak może dojść do wewnątrzkomórkowej aktywacji m-kalpiny. Wymagane milimolarne stężenia Ca^{2+} dla aktywacji enzymu *in vitro* sugerują, że fizjologiczne sygnały wapnia nie aktywują kalpiny. Zakłada się więc istnienie bliżej nie scharakteryzowanych aktywatorów, umożliwiających proteolityczne działanie m-kalpiny w fizjologicznych stężeniach tego jonu (Salamino i wsp., 1993; Mellgren, 1993). Opublikowane w ostatnich latach, interesujące wyniki eksperymentów prowadzonych na oczyszczonych enzymach (Tompa i wsp., 1996), wskazują na aktywację tej izoformy na drodze proteolizy przy udziale μ -kalpiny. Taka kaskada kalpainowa mogłaby koordynować działanie tych proteaz w żyjących komórkach. Nie wiadomo jednak, czy proces taki zachodzi *in vivo*. Istnieją dane, że kalpaina jest regulowana także przez lipidy, czynniki wzrostu i cytokiny (Zalewska i wsp., 1988; Croall, De Martino, 1990; Banik i wsp., 1992; Deshpande i wsp., 1995; Chakrabarti i wsp., 1997). Wyjaśnienie mechanizmu aktywacji kalpain *in vivo* wymaga dalszych badań.

Kalpastatyna

Proteolityczna aktywność kalpain regulowana jest także przez specyficzny dla obu kalpain endogenny inhibitor - kalpastatynę (Croall, DeMartino, 1991; Goll i wsp., 1992; Saido i wsp., 1994). Kalpastatyna w obecności wapnia inhibuje w sposób odwracalny nie tylko aktywność proteolityczną, ale także wiązanie kalpain do błon (Inomata i wsp., 1989). Zatem jej ilość w stosunku do kalpiny jest ważnym czynnikiem, regulującym stopień aktywacji proteazy. Aktywność kalpastatyny jest regulowana procesami fosforylacji/defosforylacji, prawdopodobnie przy udziale PKC (Adachi i wsp., 1991; Salamino i wsp., 1997). Interkonwersja taka mogłaby być odpowiedzialna za dostarczenie odpowiedniej ilości aktywnej formy inhibitora dla kontroli wewnątrzkomórkowej aktywności kalpain. Wyjaśnienie mechanizmów regulacji

aktywności kalpain przez kalpastatynę *in vivo* komplikuje fakt, że sama kalpastatyna jest wrażliwa na degradację przez m-kalpainę (Nagao i wsp., 1994, Salamino i wsp., 1997).

Tak więc proces fosforylacji/defosforylacji kalpastatyny, translokacja i asocjacja z błonami molekuł kalpainy i w końcu degradacja kalpastatyny, mogą stanowić część kompleksowego mechanizmu, kontrolującego działanie wapniowo-zależnego układu proteolitycznego.

Kalpainy w o.u.n.

W ośrodkowym układzie nerwowym kalpainy zlokalizowane są głównie w neuronach. Obecność m-kalpainy stwierdzono także w komórkach glejowych (Hamakubo i wsp., 1986; Nixon, 1986; Perlmutter i wsp., 1988; Onizuka i wsp., 1995). Kalpainy stanowią też składnik mieliny (Zalewska, Domańska-Janik, 1990; Li, Banik, 1995). Przyjmuje się, że kalpainy są w większości enzymami cytosolowymi (Hamakubo i wsp., 1986; Zalewska i wsp., 1989; Fukuda i wsp., 1990; Kamakura i wsp., 1992) i tylko niewielka część jest związana z frakcją cząsteczkową (Hatanaka i wsp., 1984; Gopalakrishna, Barsky, 1986; Banik i wsp., 1991, 1992).

Istnieją liczne dowody, że wapniowo-zależne proteazy - kalpainy mogą pełnić kluczową rolę w rozwoju patologii ischemicznej mózgu (Seubert, Lynch, 1990; Zalewska, Domańska-Janik, 1990; Bartus i wsp., 1995 a,b). Podczas gdy aktywność proteolityczna w warunkach fizjologicznych podlega ścisłej regulacji przez utrzymanie niskich poziomów wapnia w komórce, przerwanie homeostazy tego jonu w ischemii prowadzić może do nadmiernej stymulacji kalpain. W takich warunkach enzymy przestają być czynnikami fizjologicznymi, lecz demonstrują niekontrolowaną siłę proteolityczną, która może stać się przyczyną intensywnego katabolizmu białek wewnątrzkomórkowych (Melloni, Pontremoli, 1991).

Przedłużony proces proteolityczny, w warunkach wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, może prowadzić do poważnego uszkodzenia cytoszkieletu komórki i błony plazmatycznej, zaburzenia transportu aksonalnego a dalej

do utraty integralności i śmierci neuronów. Za udziałem kalpain w poischemicznej degeneracji przemawia obserwacja, że proteoliza specyficznego dla kalpain substratu - fodryny, wyprzedza śmierć neuronalną zarówno w ischemii globalnej jak i ogniskowej (Seubert i wsp.1989; Saido i wsp.,1993; Roberts-Levis i wsp.,1994; Bartus i wsp.,1995 a,b).

Na rolę kalpain w uszkodzeniu poischemicznym wskazują także wyniki badań z zastosowaniem inhibitorów proteaz. Stwierdzono eksperymentalnie, że zapobiegają one degradacji spektryny, zmniejszając równocześnie poischemiczne uszkodzenie neuronów (Arai i wsp.,1990; Lee i wsp.,1991; Rami, Krieglstein, 1993; Bartus i wsp., 1994, 1995b; Hong i wsp.,1994).

Liczne doniesienia sugerują włączenie kalpain w procesy apoptozy (Sarin i wsp., 1993; Roberts-Levis i wsp., 1993). Co więcej, sugestia ta zyskała ostatnio poparcie eksperymentalne. Opublikowane dane wskazują na udział kalpain w apoptozie w tymocytach, hepatocytach i neuronach hipokampa (Nath i wsp.,1996; Jordan i wsp.,1997; Squier, Cohen, 1997).

Na uwagę zasługuje także, sugerowane coraz częściej, zaangażowanie kalpain w rozwój choroby Alzheimera (Nixon, 1989; Saito i wsp., 1993; Nixon i wsp., 1994). Stwierdzono nawet wzmożoną ekspresję m-kalpainy w mózgach pacjentów z tym schorzeniem (Grynspan i wsp., 1997). Niestety, brak specyficznych inhibitorów kalpain uniemożliwia właściwą interpretację wyników eksperymentalnych.

MATERIAŁ I METODY

1. Materiał doświadczalny

Badania kalpain prowadzono, tak jak w przypadku CaMKII i PKC, na szczurach i chomikach mongolskich.

2. Modele niedokrwienia

Opis badanych modeli niedokrwienia (niedokrwienie odwracalne i ischemia podekapitacyjna) znajduje się na str. 13 i 42.

3. Przygotowanie tkanki do oznaczania aktywności kalpain

Całe półkule mózgu lub tylko wybrane struktury (jak zaznaczono w opisie poszczególnych eksperymentów) homogenizowano w 20 mM buforze Tris-HCl (pH 7.5) zawierającym 5mM EDTA, 0.1% MCE i 2mM PMSF. Homogenat sonifikowano przez 1 minutę a następnie wirowano przy szybkości 17,000g przez 20 minut. Supernatanty (frakcja rozpuszczalna) zbierano a otrzymany w wyniku wirowania osad solubilizowano 1% Tritonem X 100 w buforze homogenizacyjnym (15 minut w temperaturze 4°C) i poddawano powtórnemu wirowaniu. Frakcję rozpuszczalną homogenatu i supernatant otrzymany po solubilizacji Tritonem X100 używano do izolacji kalpain i kalpastatyny.

4. Izolacja kalpain i kalpastatyny

Rozdział μ - i m-kalpainy oraz kalpastatyny prowadzono w oparciu o metodę opisaną przez Inomata i wsp.(1983). Materiał przygotowany zgodnie z podaną wyżej procedurą nakładano na kolumnę jonowymienną (0.5 x 2cm) (DEAE-Sephacel, Pharmacia), zrównoważoną 20 mM buforem Tris-HCl (pH 7.5) zawierającym 0.1%

MCE (bufor A). Elucję μ -kalpains i kalpastatyny prowadzono 0.2 M KCl w buforze A, natomiast m-kalpains eluowano 0.4 M KCl. W następnym etapie oddzielano μ -kalpains od kalpastatyny. W tym celu frakcje eluowane 0.2 M KCl nakładano na kolumnę, wypełnioną złożem hydrofobowym (Phenyl-Sepharose CL-4B, Pharmacia), zrównoważonym 0.3 M KCl w buforze A. Kalpastatynę wymywano buforem stosowanym do zrównoważenia kolumny, natomiast μ -kalpains eluowano 20% glikolem etylenowym. Preparatykę prowadzono w temperaturze 0 - 4°C. Aktywność kalpain oznaczano we frakcjach eluowanych z kolumny jonowymiennej 0.4 M NaCl jak i we frakcjach eluowanych glikolem z kolumny hydrofobowej, Aktywność kalpastatyny oznaczano w eluacie 0.3 M KCl.

5. Oznaczenie aktywności kalpain

Zależną od Ca^{2+} aktywność kalpain oznaczano mierząc intensywność proteolizy znakowanej fluoresceiną kazeiny w temperaturze 37°C w czasie 30 minut. Reakcję hamowano zimnym 5% TCA z dodatkiem 0.01% Tritonu X-100, wirowano przy 10,000g przez 10 minut i mierzono fluorescencję supernatantu (przy długości fali pobudzenia 287 nm, emisji 518 nm). Aktywność proteolityczną obliczano z różnicy wartości fluorescencji w obecności wapnia i EGTA (Wolfe i wsp., 1989) przyjmując, że zmiana ekstynkcji o 0.1 odpowiada 1 jednostce (U). Aktywność specyficzną przedstawiano w jednostkach fluorescencji U/mg białka/30 min.

6. Oznaczenie aktywności kalpastatyny

Frakcje eluowane 0.3 M KCl w buforze A z kolumny o złożu hydrofobowym, zawierające kalpastatynę, gotowano przez 10 minut w celu usunięcia prawdopodobnej endogennej aktywności proteolitycznej i oznaczano zdolność otrzymanych po wirowaniu supernatantów do inhibicji aktywności egzogennej kalpains. Do stałej ilości enzymu dodawano wzrastające objętości supernatantów. Zdolność inhibicji była obliczana z

odcinka krzywej, prezentującego prostoliniową zależność (Blomgren i wsp.,1989). Jedna jednostka kalpastatyny odpowiada takiej ilości, która inhibuje 1 jednostkę kalpainy.

Aktywność inhibicyjną kalpainy przeliczono na mg białka natywnego homogenatu.

7. Reakcja immunochemiczna

Poziom produktów rozpadu fodryny (FBDP) jak i poziom białka kalpain w homogenatach i frakcjach uzyskanych po wirowaniu homogenatu (rozpuszczalnej i cząsteczkowej) oceniano przy pomocy techniki Western blotu. Dane dotyczące stosowanych w poszczególnych eksperymentach przeciwciał włączono do opisu rycin.

8. Inne procedury

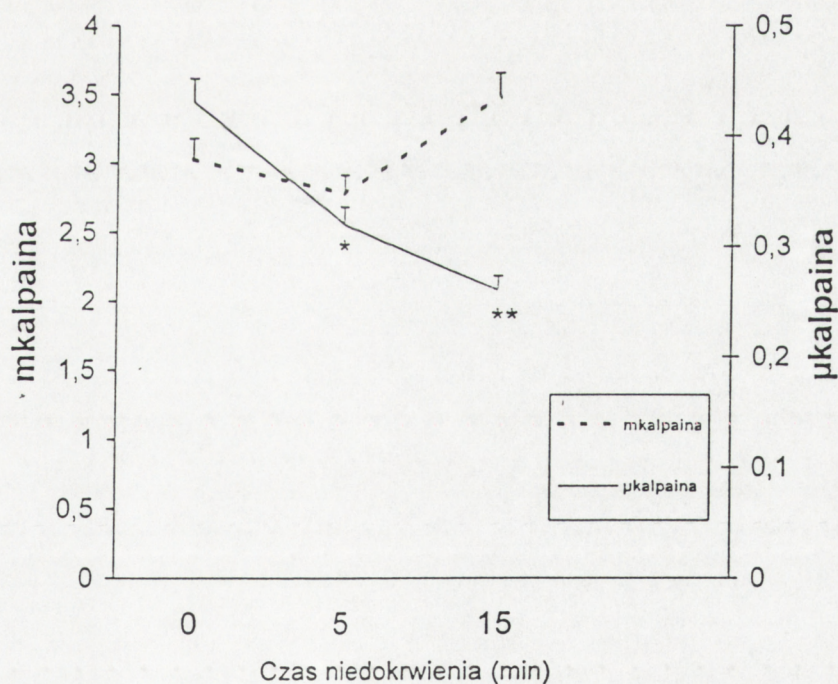
Metody oznaczania białka i sposób przeprowadzenia analizy statystycznej podane są na str.16.

WYNIKI

1. Wpływ nieodwracalnego niedokrwienia na układ zależnej od wapnia proteolizy (kalpaina-kalpstatyna) w mózgu szczura

1.1. Aktywność enzymatyczna i lokalizacja komórkowa μ i m-kalpainy

W tym etapie badań sprawdzono, czy ostry stres niedokrwieny (ischemia podekapitacyjna) zmienia wapniowo-zależną specyficzną aktywność proteolityczną μ - i m-kalpainy. Oznaczenia aktywności enzymatycznej prowadzono w układach *in vitro* w optymalnych warunkach. Materiałem badawczym był zarówno homogenat mózgu (aktywność całkowita) jak i frakcje: cząsteczkowa i rozpuszczalna, otrzymane po rozwirowaniu homogenatu.



Ryc. 12. Wpływ ischemii podekapitacyjnej na aktywność całkowitą kalpain w mózgu szczura.

Metoda izolacji i oznaczenia aktywności kalpain opisana w rozdziale Materiał i Metody. Aktywność kalpain wyrażona w jednostkach fluorescencji U/mg białka/30 minut. Każda wartość jest średnią arytmetyczną \pm SEM uzyskaną z analizy pięciu zwierząt przy trzech powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do kontroli są zaznaczone * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

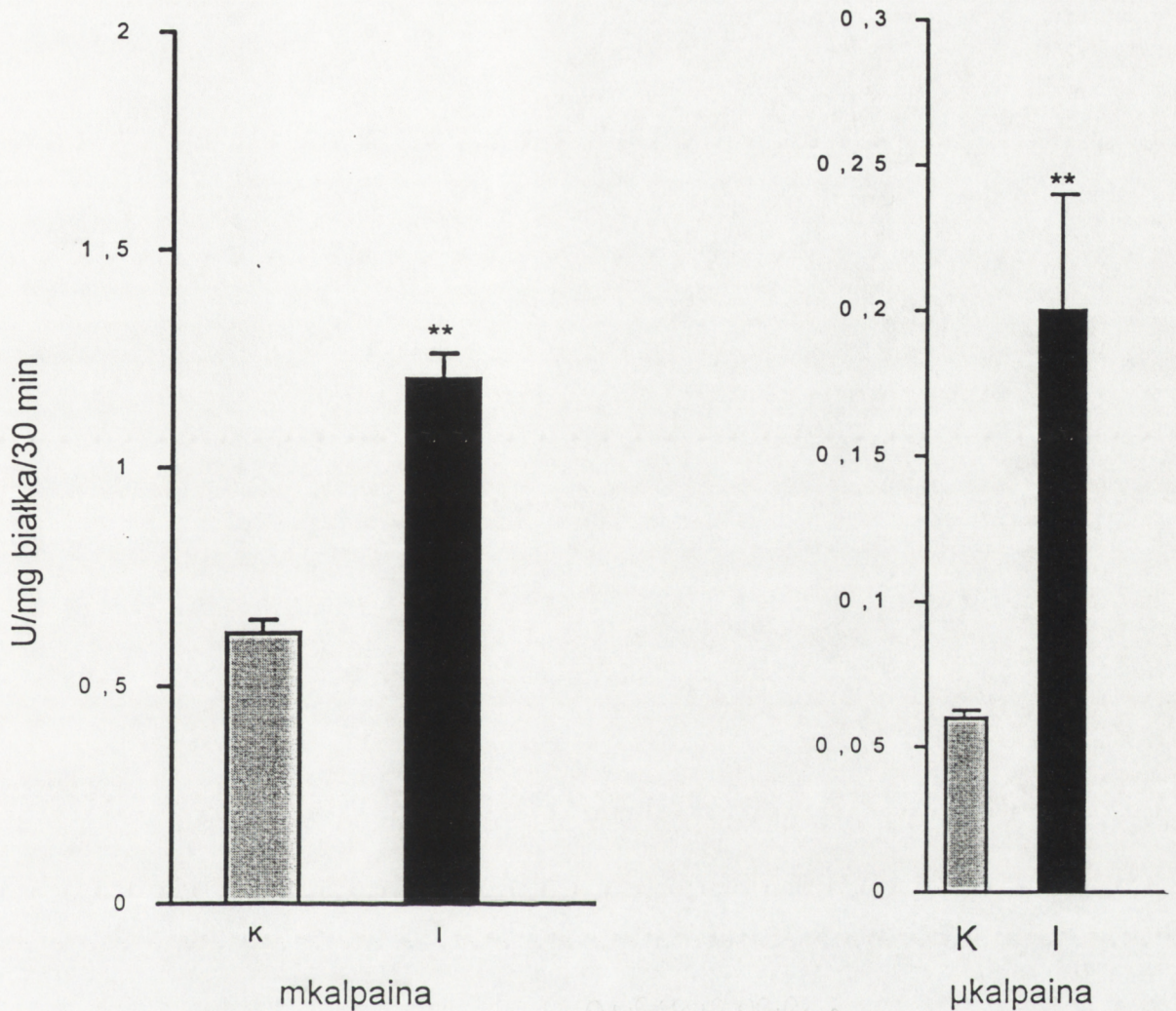
Rycina 12 przedstawia dynamikę zmian całkowitej aktywności proteolitycznej kalpain w mózgu szczura poddanego ischemii podekapitacyjnej trwającej 5 lub 15 minut. Uzyskane wyniki wskazują na różną wrażliwość badanych izoenzymów na ischemię. Podczas gdy poziom aktywności m-kalpainy nie zmieniał się w sposób znaczący w opisanym modelu doświadczalnym, aktywność formy μ spadała do 85% wartości kontrolnych po 5 minutach od momentu przerwania dopływu krwi do mózgu. Przy przedłużeniu czasu ischemii do 15 minut ulegała ona dalszemu obniżeniu, do 60% wartości kontrolnych.

Ischemia wpływała również na wewnątrzkomórkową dystrybucję enzymu. W mózgach zwierząt kontrolnych około 80% aktywności proteolitycznej kalpain znajduje się we frakcji rozpuszczalnej (tabela 6). Po 15 minutach ischemii podekapitacyjnej aktywność proteolityczna związana z pulą rozpuszczalną m- i μ -kalpains obniżała się odpowiednio do 62 i 23%, podczas gdy proporcjonalnie rosła aktywność puli związanej z frakcją cząsteczkową. W konsekwencji po 15 minutach ischemii aktywność m-kalpains osiągnęła 200 a μ -kalpains 350% wartości kontrolnych oznaczanych w tej frakcji (ryc.13).

Tabela 6. Wpływ ischemii podekapitacyjnej na wewnątrzkomórkową lokalizację kalpain w mózgu szczura

	m-kalpaina			μ -kalpaina	
	Rozpuszczalna	Cząsteczkowa		Rozpuszczalna	Cząsteczkowa
Kontrola	80 \pm 3	20 \pm 4	Kontrola	85 \pm 8	15 \pm 3
Ischemia	62 \pm 5**	38 \pm 5**	Ischemia	23 \pm 4**	77 \pm 9**

Zamieszczone dane wyliczono z proporcji aktywności kalpain we frakcji rozpuszczalnej do sumy aktywności frakcji rozpuszczalnej i cząsteczkowej i wyrażono w % całkowitej aktywności. Każda wartość jest średnią arytmetyczną \pm SEM uzyskaną z analizy pięciu zwierząt przy trzech powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do kontroli są zaznaczone **p < 0.01



Ryc. 13. Wpływ ischemii na aktywność kalpain we frakcji cząsteczkowej mózgu szczura.

Metoda izolacji kalpain z frakcji cząsteczkowej i oznaczenia aktywności zawarta w tekście. Aktywność kalpain wyrażono w jednostkach fluorescencji U/mg białka /30 minut. Każda wartość jest średnią arytmetyczną \pm SEM uzyskaną z analizy pięciu zwierząt przy trzech powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do kontroli są zaznaczone ** $p < 0.01$. K - kontrola; I - niedokrwienie.

Ischemia nieodwracalna powoduje spadek aktywności proteolitycznej μ -kalpainy, przy niezmiennym poziomie aktywności drugiej z izoform.

Wspólną odpowiedzią obu kalpain (μ i m) na ostry stres niedokrwienno jest ich przemieszczenie do frakcji cząsteczkowej.

Większą wrażliwość na ischemię wykazuje μ -kalpain, co może świadczyć o różnym udziale badanych izoenzymów w rozwoju patologii poischemicznej.

1.2. Poziom natywnej (pre-autolitycznej) i aktywnej (post-autolitycznej) formy μ -kalpainy

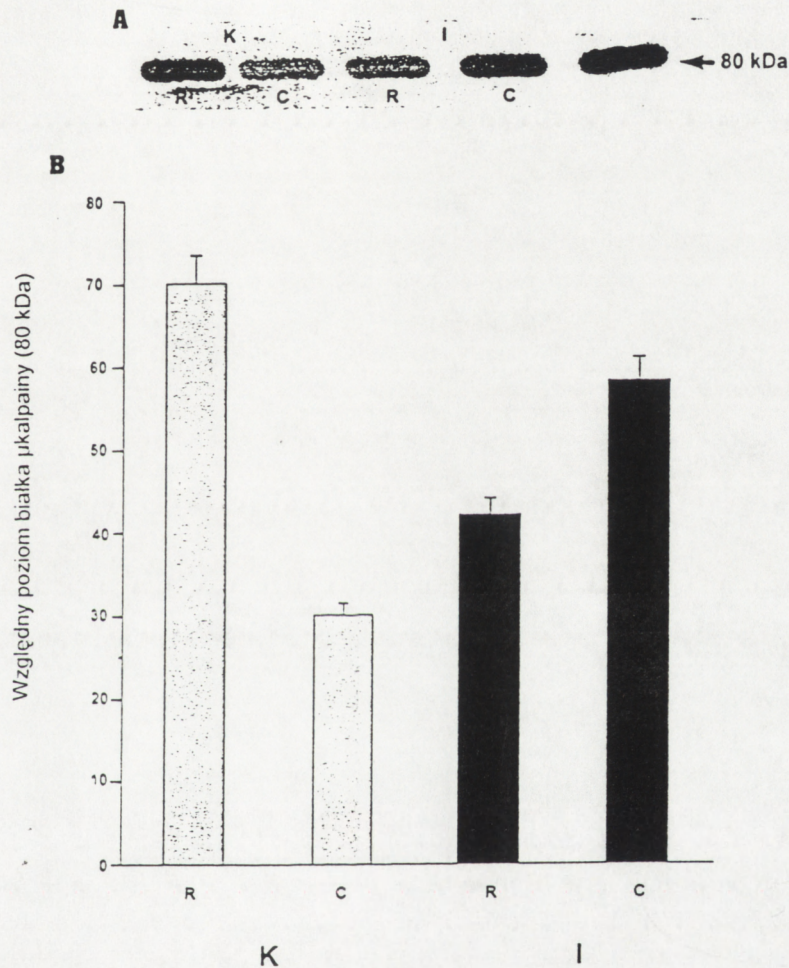
Według ogólnie przyjętego schematu warunkiem niezbędnym do aktywacji kalpain, poza wykazanim w poprzednim podrozdziale przemieszczeniem ich do błon, jest autoliza cząsteczki enzymu do formy aktywnej. Powstająca forma post-autolityczna jest bardzo podatna na dalszy rozpad proteolityczny. Zakładając, że intensywna autoliza kalpain w czasie ischemii mogłaby być odpowiedzialna zarówno za jej krótkotrwałą aktywację jak i obserwowany stopniowy spadek aktywności, oznaczono poziom białka formy natywnej (preautolitycznej) i formy aktywnej (post-autolitycznej) μ -kalpainy. Zastosowane przeciwciała były darem dr T.C. Saido z Instytutu Nauk Medycznych, Tokio (Saido i wsp. 1992).

Ryciny 14 A i 15 demonstrują reprezentatywne bloty, wykonane dla obu badanych form kalpainy: pre- i post-autolitycznej. Dla weryfikacji pozycji badanych podjednostek włączono pozytywną kontrolę oczyszczonej kalpainy natywnej (80 kDa) i autolizowanej (76 kDa). Przeciwciała skierowane przeciwko dużej podjednostce μ -kalpainy reagowało specyficznie z białkiem o ruchliwości elektroforetycznej identycznej z tą, jaką prezentowała oczyszczona kalpaina (80 kDa). Prążek białka o ruchliwości odpowiadającej 76 kDa reprezentuje autolizowaną podjednostkę μ -kalpainy. Zastosowane dla tej formy przeciwciała nie wykazywało wysokiej specyficzności i na blocie obserwowano również szereg immunoreaktywności niespecyficznych.

Rycina 14 B demonstruje wyniki ilościowej densytometrii immunoreaktywności formy preautolitycznej (80 kDa) i jej rozmieszczenie subkomórkowe w warunkach kontrolnych i po ischemii. Prezentowane dane wskazują, że w stanie fizjologicznym proenzym μ -kalpainy zlokalizowany jest głównie we frakcji rozpuszczalnej (70% całkowitego białka formy natywnej). Poziom białka formy postautolitycznej natomiast w obu badanych frakcjach wykazuje daleko idące podobieństwo: 57% we frakcji rozpuszczalnej i 43% we frakcji cząsteczkowej (ryc. 15).

W wyniku niedokrwienia poziom białka natywnej kalpainy w homogenacie obniżał się o 12%, a aktywnej formy post-autolitycznej o 26% (ryc 16). Nieznaczne

obniżenie poziomu pro-kalpiny w efekcie przebytego szoku ischemicznego sugeruje, że jedynie niewielka część enzymu natywnego została przekształcona w formę aktywną. Niemniej w tych warunkach dochodzi do relatywnego wzrostu immunoreaktywności obu form we frakcji błonowej (translokacja) z tym, że akumulacja formy post-autolitycznej jest tu znacznie niższa (ryc. 14, 15, 16).

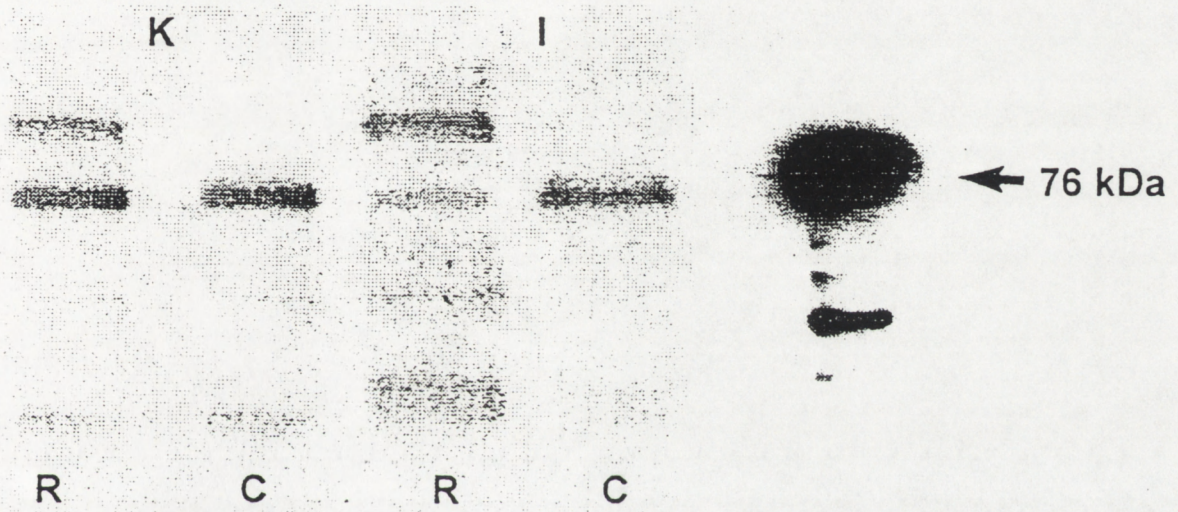


Ryc. 14. Wpływ ischemii podekapitacyjnej na poziom białka formy natywnej μ -kalpiny w subkomórkowych frakcjach mózgu szczura.

A) Reprezentatywny immunoblot demonstrujący wpływ ischemii podekapitacyjnej na poziom immunoreaktywności natywnej formy μ -kalpiny we frakcjach: rozpuszczalnej (R) i cząsteczkowej (C) homogenatu mózgu szczura. Reakcję immunochemiczną prowadzono z przeciwciałem dla dużej podjednostki (80kDa) μ -kalpiny i uwidaczniano metodą wzmacnionej chemiluminescencji. K- kontrola; I- ischemia;

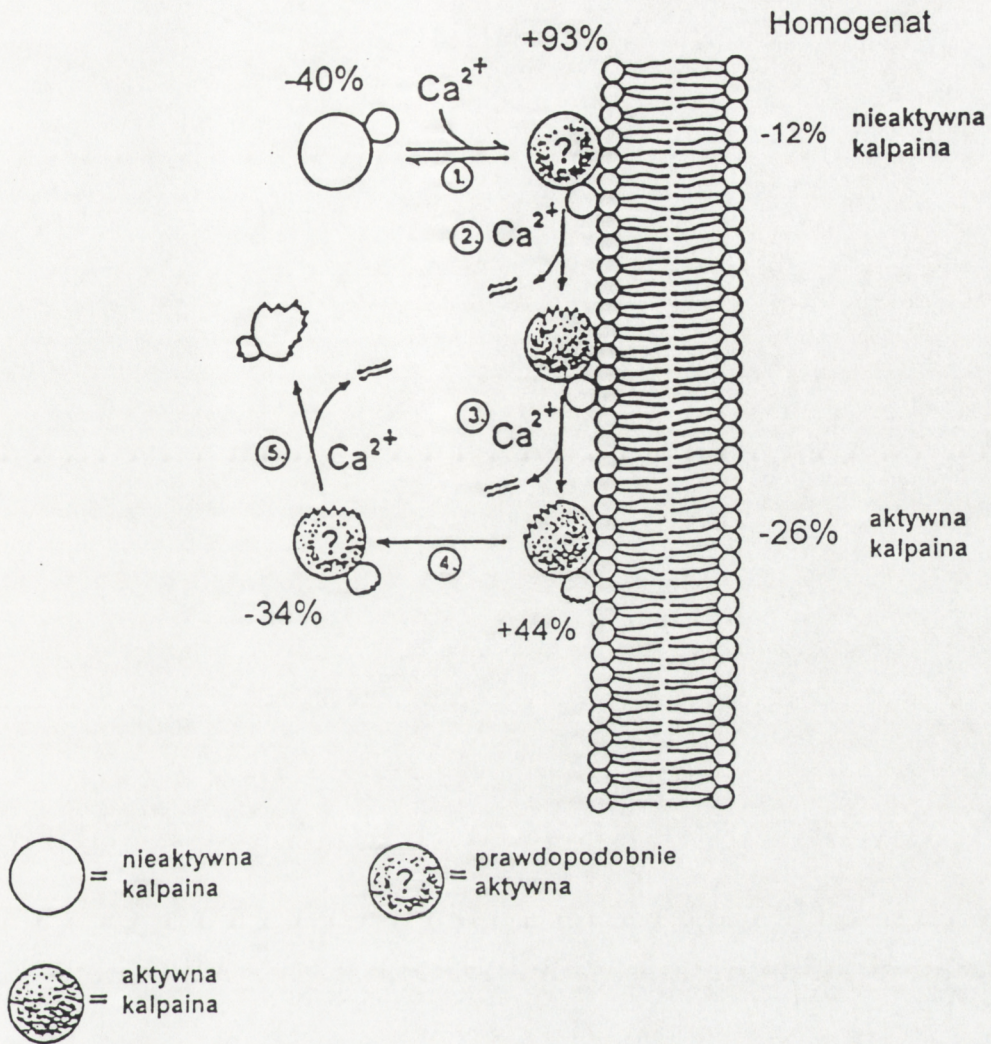
B. Względny poziom białka μ -kalpiny (80 kDa) we frakcjach homogenatu mózgu szczura w kontroli (K) i po ischemii podekapitacyjnej (I) w odniesieniu do przyjętego za 100% poziomu w homogenacie. Zamieszczone wartości uzyskano w wyniku analizy densytometrycznej wykonanych immunoblotów. Wartości są średnimi \pm SD otrzymanymi w wyniku analizy trzech zwierząt w każdej grupie eksperymentalnej, przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. R-frakcja rozpuszczalna; C- frakcja cząsteczkowa.

Podsumowanie tej części badań zilustrowano przy pomocy uproszczonego modelu mechanizmu autolitycznej aktywacji enzymu na błonach (ryc. 16), z zaznaczeniem zmian poniedokrwiennych (wyrażonych w stosunku do wartości początkowej przyjętej za 100%). Ze względu na zastosowanie do badań różnych przeciwciał o różnym stopniu specyficzności, nie jest możliwe dokładniejsze zdefiniowanie stosunku ilościowego pomiędzy formą natywną a aktywną μ -kalpainy.



Ryc. 15. Wpływ ischemii podekapitacyjnej na poziom białka formy aktywnej μ -kalpainy (76 kDa) w subkomórkowych frakcjach mózgu szczura.

Reprezentatywny immunoblot demonstrujący wpływ ischemii podekapitacyjnej na immunoreaktywność aktywnej (postautolitycznej) formy μ -kalpainy (76 kDa) we frakcjach: rozpuszczalnej (R) i cząsteczkowej (C) homogenatu mózgu szczura. Reakcję immunochemiczną prowadzono z przeciwciałem specyficznym dla dużej podjednostki formy aktywnej μ -kalpainy i uwidacziano metodą wzmocnionej chemiluminescencji. K- kontrola; I-ischemia.



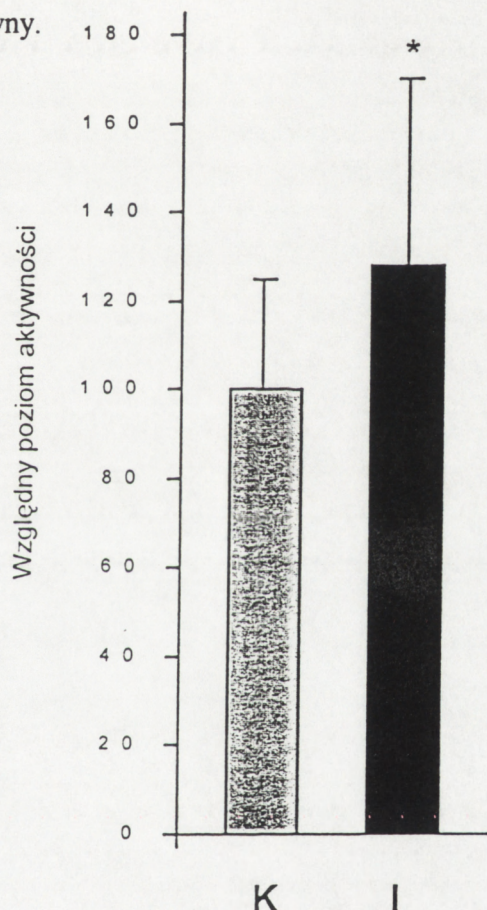
Ryc. 16. Mechanizm autolitycznej aktywacji kalpain.

W obecności podwyższonego poziomu wapnia w cytosolu nieaktywna kalpaina wiąże się z białkami błony plazmatycznej (1) i w obecności wapnia ulega przekształceniu w formę aktywną na drodze ograniczonej autolizy (2). W pierwszym etapie autolizy ulega duża podjednostka, a następnie podjednostka mała (3). Aktywna, post-autolityczna forma kalpaina jest zdolna do proteolizy białek błon, lub (po przemieszczeniu do cytosolu) do proteolizy białek rozpuszczalnych (4). Inhibicja aktywności katalitycznej kalpaina może zachodzić w wyniku dalszej proteolizy białka enzymatycznego (5). Ischemia podekapitacyjna obniża poziom białka formy natywnej i aktywnej w homogenacie mózgu odpowiednio o 12 i 26%. Równocześnie obserwuje się przemieszczenie kalpaina z cytosolu do błon plazmatycznych: poziom formy natywnej w błonach po ischemii rośnie w stosunku do aktywności początkowej (przed ischemią) o 93%, natomiast formy post-autolitycznej o 44%. Przyrostowi kalpaina w błonach towarzyszy niemal równomierne obniżenie poziomu obu form enzymu w cytosolu.

Aktywacyjna autoliza pro-kalpaina, inicjująca jej dalszy rozpad, może być odpowiedzialna za chwilowy wzrost a następnie spadek aktywności i ilości białka enzymatycznego μ -kalpaina w trakcie niedokrwienia.

1.3. Aktywność endogennego inhibitora kalpain - kalpastatyny

Celem sprawdzenia, czy stopniowy spadek aktywności μ -kalpainy w ischemii mózgu łączy się ze zmianami aktywności kalpastatyny, oznaczono aktywność tego endogennego inhibitora. Ryc. 17 demonstruje aktywność inhibicyjną kalpastatyny w homogenatach mózgu szczura kontrolnego i poddanego ischemii podekapitacyjnej. Niedokrwienie trwające 15 minut prowadziło do umiarkowanego, 28% -wego wzrostu aktywności kalpastatyny.



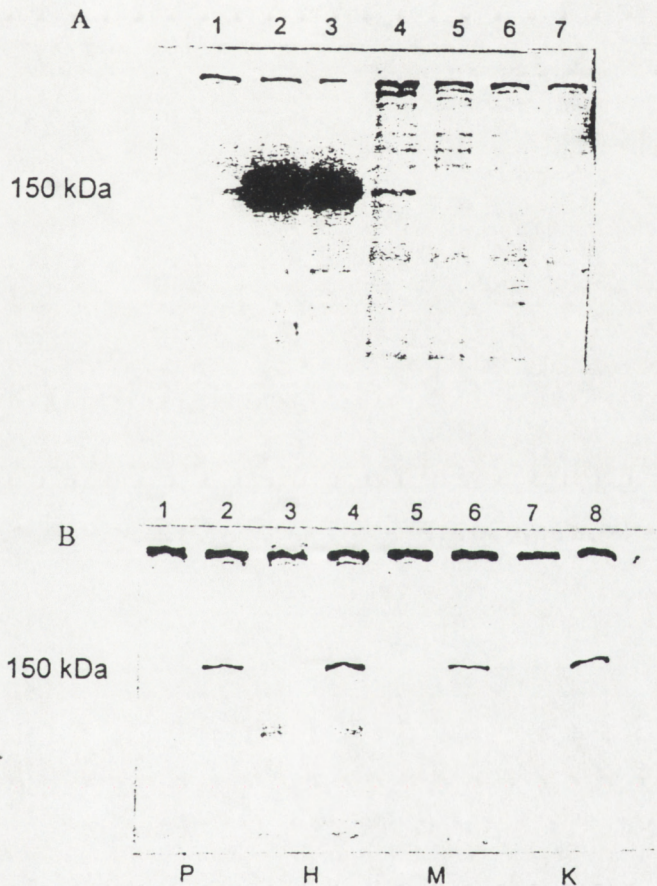
Ryc. 17. Aktywność kalpastatyny w mózgu szczura po ischemii podekapitacyjnej.

Metodę izolacji i oznaczania aktywności kalpastatyny opisano w rozdziale Materiał i Metody. Inhibicyjna aktywność kalpastatyny w mózgach zwierząt kontrolnych wynosiła 2.09 ± 0.40 a po ischemii 2.68 ± 0.80 jednostek U/mg białka. Wartości zamieszczone na wykresie (wyrażone w procentach kontroli) są średnimi \pm SEM uzyskanymi na podstawie analizy ośmiu zwierząt w każdej grupie eksperymentalnej. Znamienne statystycznie różnica w stosunku do kontroli wynosiła $*p < 0.05$

Wzrost aktywności kalpastatyny może dodatkowo hamować aktywność μ -kalpainy w ostrym niedokrwieniu.

1.4. Proteoliza specyficznego substratu kalpain - fodryny

Przyrost produktów proteolitycznego rozpadu fodryny, jednego ze specyficznych substratów kalpain, jest powszechnie stosowanym markerem jej aktywności proteolitycznej. W naszych badaniach był to dodatkowy wskaźnik funkcjonalnej aktywności kalpain w czasie niedokrwienia mózgu.



Ryc. 18. Western bloty homogenatów mózgu wykonane przy użyciu przeciwciała skierowanego przeciwko 150 kDa produktowi rozpadu fodryny (ang. FBDP).

A) ścieżka nr 1 - homogenat mózgu szczura kontrolnego; nr 4 - homogenat mózgu zwierzęcia poddanego 15 min ischemii; nr 3 i 2 - homogenaty inkubowane 5 i 15 minut w obecności 5 mM CaCl_2 , w obecności 10 μg leupeptyny (nr 5) lub w obecności 10 mM EGTA w czasie 5 lub 15 min (6 i 7).

B) Wybrane struktury mózgu zwierzęcia kontrolnego i poddanego ischemii. Ścieżki nr 1,3,5,7 - homogenaty mózgów zwierząt kontrolnych, ścieżki nr 2,4,6,8 - homogenaty mózgów szczurów poddanych 15 minutowej ischemii.

P - prążkowie, H- hipokamp, M - mózdzek, K - kora mózgu.

Na rycinach zaznaczono pozycję białka o ruchliwości elektroforetycznej 150 kDa.

Wyniki wskazują, że ostry stres niedokrwienny, trwający 15 minut, prowadzi do degradacji fodryny. Zastosowanie specyficznego przeciwciała (Saido i wsp., 1993) pozwoliło na zidentyfikowanie powstającego w wyniku proteolizy kalpainowej fragmentu α fodryny, który na Western blotcie pojawia się jako 1 lub dwa prążki o ruchliwości elektroforetycznej odpowiadającej 150-155 kDa (ryc. 18). Produkt ten jest niewykrywalny zarówno w świeżych homogenatach mózgów zwierząt kontrolnych (ryc. 18 A, ścieżka 1), jak i w homogenatach inkubowanych w obecności inhibitora proteaz cysteinowych-leupeptyny, czy też w środowisku nie zawierającym wapnia (ryc.18A odpowiednio ścieżki 5; 6,7).

Pojawienie się prążka immunoreaktywnego w czasie inkubacji homogenatu zależało od obecności jonu wapnia i było wprost proporcjonalne do czasu inkubacji. Prążek 150 kDa był jedynym prążkiem wykazującym wyraźny wzrost immunoreaktywności w czasie inkubacji homogenatu w obecności wapnia (ryc.18A, ścieżka nr 2,3).

Należy podkreślić, że obserwowany w naszych eksperymentach wzrost produktów proteolitycznego rozpadu fodryny po 15 minutowej ischemii globalnej nie wykazywał żadnej specyficzności topograficznej i widoczny był we wszystkich badanych okolicach mózgu: korze mózgu, prążkowie, hipokampie i mózdzku (ryc. 18 B).

Zależność proteolizy fodryny w układzie in vitro od obecności jonów wapnia jak i jej hamowanie przez inhibitor proteaz wskazuje jednoznacznie na udział kalpain w tym procesie.

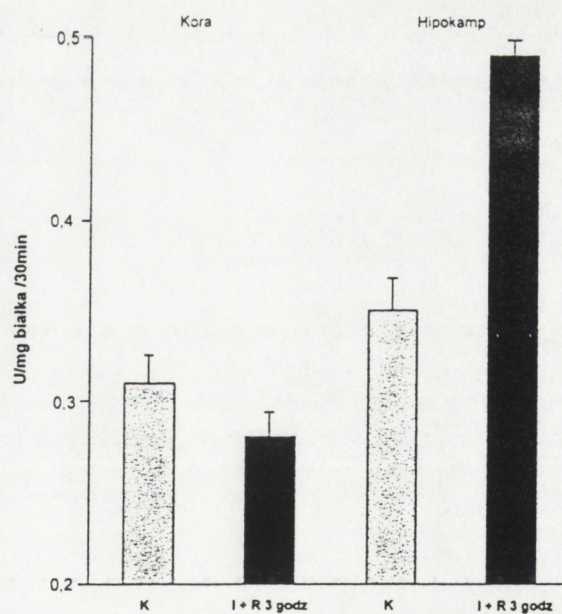
Przyrost produktów rozpadu fodryny indukowany ostrym stresem niedokrwiennym wskazuje, że proteolityczna aktywność kalpain rzeczywiście wzrasta w niedokrwionej tkance "in situ".

Wywołana ostrym niedokrwieniem proteoliza fodryny ma charakter uogólniony i nie wykazuje specyficzności topograficznej.

2. Wpływ niedokrwienia odwracalnego i reperfuzji na aktywność i lokalizację subkomórkową kalpain w korze mózgu chomika mongolskiego

2.1. Aktywność m kalpainy

Ze względu na ograniczoną ilość badanej tkanki (hipokamp) i stosunkowo niski poziom aktywności μ -kalpainy, (około 10% aktywności całkowitej) (ryc.12)), określono jedynie aktywność m izoformy. Oznaczenie wykonano w niedokrwionym hipokampie i korze mózgu chomików mongolskich poddanych 3 godzinnej reperfuzji po 5-minutowej ischemii, a więc w czasie, w którym obserwowano najsilniejszą reakcję poischemiczną w innych badaniach hipokampa. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie wykresu (ryc. 19).



Ryc. 19. Wpływ ischemii i reperfuzji na atywność m-kalpainy w mózgu chomika mongolskiego.

Wartości aktywności przedstawione w jednostkach fluorescencji/mg białka/ 30 minut są wartościami średnimi \pm SD otrzymanymi w wyniku analizy trzech zwierząt w każdej grupie eksperymentalnej przy dwukrotnym powtórzeniu każdego oznaczenia.
K - kontrola; I - niedokrwienie; R - reperfuzja.

Oznaczona po 3 godzinach reperfuzji aktywność m-kalpainy wykazuje poziom znamienne wyższy od wartości kontroli jedynie w hipokampie. Wysoka aktywność enzymatyczna, dwukrotnie przekraczająca poziomy kontrolne, obserwowana była również po 3 dniach od epizodu ischemicznego (wyniki własne, nie zamieszczone w prezentowanej pracy). U tych samych zwierząt nie zaobserwowano żadnych znaczących zmian aktywności m-kalpainy w korze przodomózgowia.

Wzrost aktywności m-kalpainy występuje jedynie w hipokampie, utrzymując się przez dłuższy czas po zakończeniu epizodu ischemicznego.

2.2. Ilość i lokalizacja subkomórkowa kalpain w mózgu chomika mongolskiego

Ewolucję zmian ilości i lokalizacji subkomórkowej kalpain w hipokampie mózgu chomika mongolskiego bezpośrednio po ischemii i w różnym czasie po przywróceniu krążenia demonstruje rycina 20. Poziomy białka enzymatycznego określono metodą immunochemiczną, przy zastosowaniu przeciwciała 1D10A7 rozpoznającego oba izoenzymy kalpain, ale wykazującego siedmiokrotnie wyższe powinowactwo do m-kalpainy (Kasai i wsp. 1986).

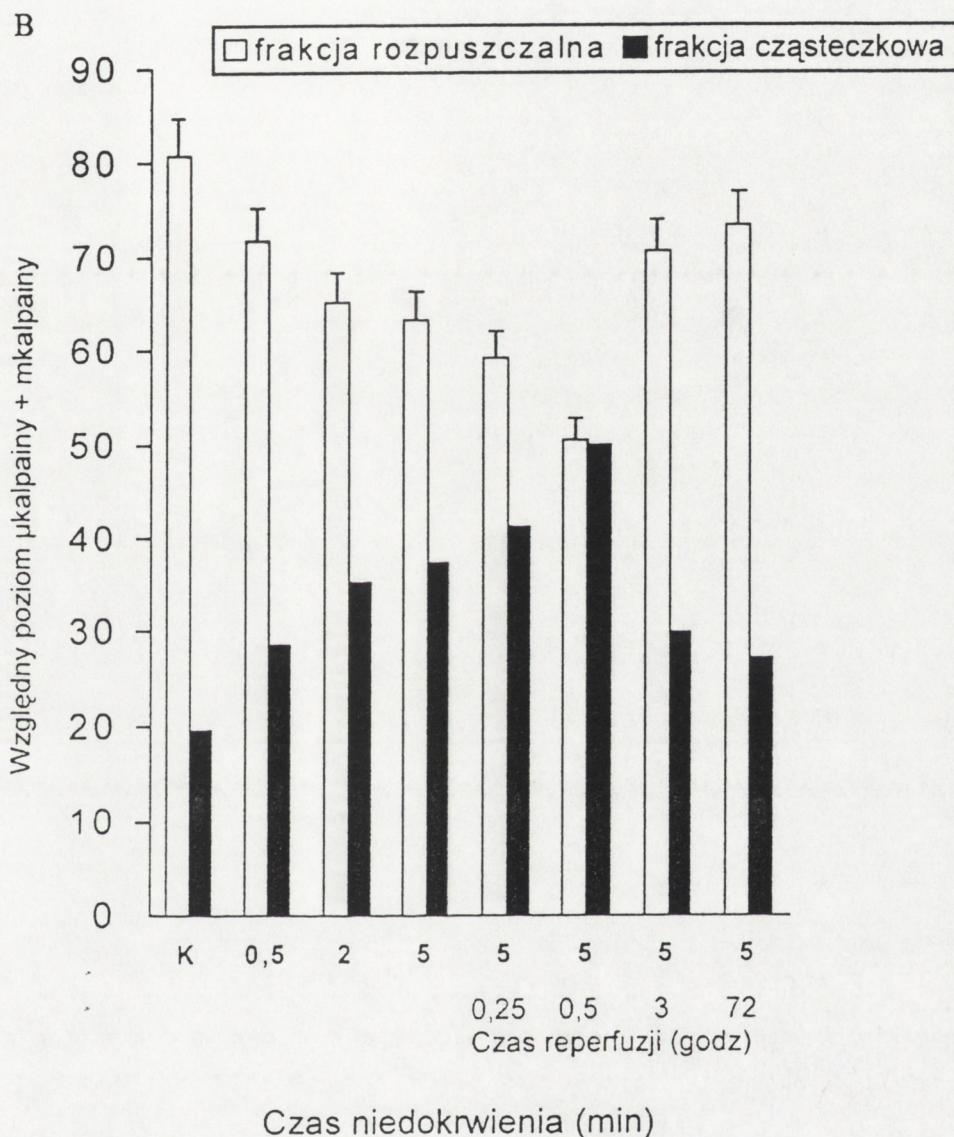
Ischemia odwracalna polegająca na zaciśnięciu tętnic szyjnych wspólnych u gerbila na okres do 5 minut, podobnie jak ostre niedokrwienie mózgu szczura (ischemia podekapitacyjna), powodowała natychmiastowe przemieszczenie kalpain z frakcji rozpuszczalnej do frakcji błonowej, bez istotnego wpływu na całkowitą ilość białka enzymu. Istotny, prawie dwukrotny wzrost poziomu białka enzymatycznego w tej frakcji, przy równoczesnym jego obniżeniu we frakcji rozpuszczalnej, obserwuje się już po dwóch minutach niedokrwienia. Należy zaznaczyć, że u części badanych zwierząt znaczący przyrost we frakcji błonowej widoczny był już po 30 sekundach. Przedłużenie czasu ischemii do 5 minut nie prowadziło do dalszych znaczących zmian lokalizacji

enzymu. Proces przemieszczania białka z frakcji rozpuszczalnej do frakcji błon obserwowany jest nadal po przywróceniu krążenia. Tendencja wzrostowa utrzymuje się do 30 minut, kiedy to notuje się najwyższy, w porównaniu z kontrolą, poziom kalpain w błonach. Począwszy od tego momentu następuje stopniowa normalizacja i w konsekwencji już po 3 godzinach, u większości zwierząt, wzór dystrybucji białka enzymatycznego w badanych frakcjach był zbliżony do kontroli i nie zmieniał się w sposób znaczący do 72 godzin po przywróceniu krążenia. Opisane zmiany ograniczone były jedynie do hipokampa. W korze mózgu tych samych zwierząt eksperymentalnych nie stwierdzono zmian rozdziału kalpain pomiędzy badane frakcje subkomórkowe.

Określony metodą immunochemiczną poziom całkowitego białka kalpain ulegał stosunkowo nieznacznym zmianom w przebiegu eksperymentu (tabela 7). Niewielki spadek immunoreaktywności (o 15%) obserwowano bezpośrednio po 5 minutach ischemii jak i po 30 minutach reperfuzji w homogenacie hipokampa. Natomiast odnotować należy znamienny wzrost immunoreaktywności do 130% wartości kontrolnej, jaki miał miejsce w tej strukturze po 3 godzinach od momentu przywrócenia krążenia. Ischemia trwająca 5 minut nie wpływała na poziom białka całkowitego w korze przodomózgowia. Dopiero przedłużenie czasu niedokrwienia do 15 minut prowadziło do znaczniejszego obniżenia ilości białka w korze przodomózgowia (o 20%) jak i w hipokampie (o 35%), co przypomina reakcję obserwowaną w ischemii globalnej u szczurów.

A

← 80 kDa



Ryc. 20. Wpływ niedokrwienia i reperfuzji na subkomórkową lokalizację kalpain ($\mu + m$) w hipokampie mózgu chomika mongolskiego.

A) Immunoblot demonstrujący zmiany poziomu kalpain we frakcji cząsteczkowej hipokampa w czasie ischemii (0.5 - 5 minut) i reperfuzji. Immunoreakcję prowadzono z przeciwciałem 1D10A7 i uwidaczniło metodą wzmocnionej chemiluminescencji. Kolejność ścieżek na immunoblocie odpowiada punktom czasowym zaznaczonym na osi odciętych wykresu B.

B) Poziom kalpain we frakcjach hipokampa mózgu szczura w czasie ischemii (0.5 - 2 minut) i reperfuzji wyrażony w wartościach względnych (w stosunku do przyjętego za 100% poziomu kalpain w homogenacie). Dane zamieszczone na wykresie uzyskano przy zastosowaniu ilościowej densytometrii Western blotów wykonanych dla obu badanych frakcji hipokampa: cząsteczkowej i rozpuszczalnej.

Przedstawione wartości są średnimi \pm SD uzyskanymi w wyniku analizy trzech zwierząt w każdej grupie eksperymentalnej przy trzykrotnym powtórzeniu każdego z oznaczeń.

Tabela 7. Wpływ ischemii na poziom białka kalpain w homogenatach z wybranych struktur mózgu chomika mongolskiego.

	Względne wartości w stosunku do kontroli (%)	
	Hipokamp	Kora
Ischemia 5 min	85 ± 6	100
Ischemia 5 minut + R 0.5 godz	85 ± 9	100
Ischemia 5 minut + R 3 godz	130±12	100
Ischemia 15 min	65 ± 13	80 ± 10

Dane zamieszczone w tabeli są średnimi ± SD uzyskanymi na drodze analizy trzech zwierząt w każdej grupie eksperymentalnej

Niewielki spadek poziomu białka całkowitego w hipokampie sugeruje, że jedynie niewielka część natywnego enzymu ulegała aktywacji w przebiegu niedokrwienia i w początkowym etapie reperfuzji.

Zmiany lokalizacji subkomórkowej kalpain w czasie niedokrwienia i reperfuzji ograniczone są do hipokampa.

Natychmiastowe przesunięcie kalpain do frakcji cząsteczkowej świadczyć może o aktywacji enzymów i ich roli w zapoczątkowaniu sygnału patologicznego wywołanego niedokrwieniem w hipokampie mózgu chomika mongolskiego.

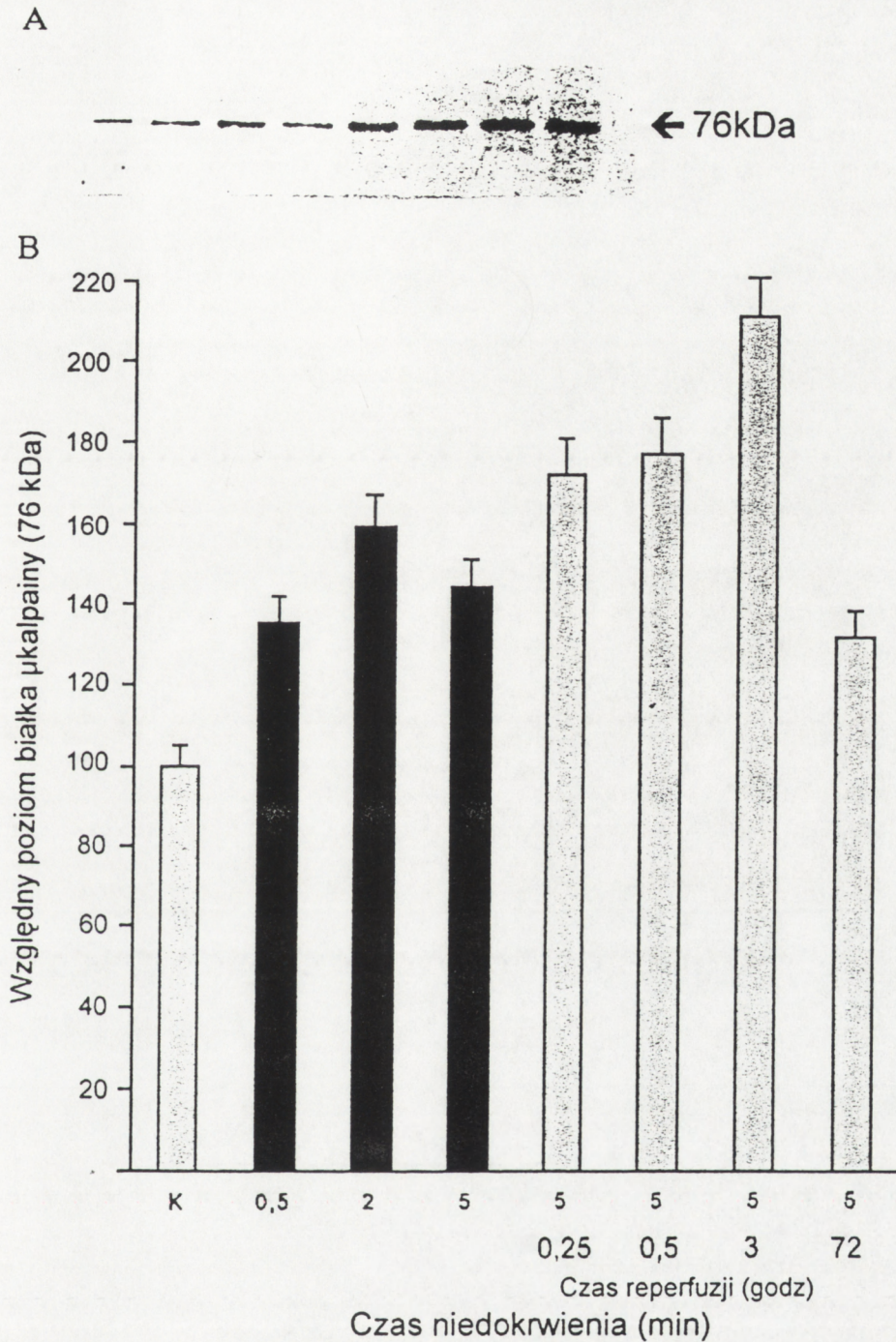
2.3. Określenie poziomu białka formy aktywnej μ -kalpains (76 kDa) w hipokampie mózgu chomika mongolskiego.

Celem tej części badań była ocena stopnia aktywacji μ -kalpains poprzez określenie ilości formy aktywnej (76 kDa) bezpośrednio po niedokrwieniu i w czasie po przywróceniu krążenia.

Badania immunochemiczne, wykonane przy zastosowaniu przeciwciała specyficznego dla aktywnej 76 kDa formy enzymu, wskazują na przyrost immunoreaktywności formy autolizowanej w homogenacie mózgu o 50% już po 2 minutach od momentu zatrzymania dopływu krwi (ryc. 21). Najwyższy, sięgający 200%, poziom białka 76 kDa obserwowano po 3 godzinach reperfuzji. W późniejszych czasach immunoreaktywność tej formy wykazuje tendencję do powrotu do wartości znalezionych u zwierząt kontrolnych, aczkolwiek jeszcze po 72 godzinach reperfuzji pozostaje na nieco wyższym od kontroli poziomie. Należy zaznaczyć, że forma aktywna związana była głównie z frakcją cząsteczkową i tutaj prezentowała wartości i kierunek zmian analogiczny jak w homogenacie. We frakcji rozpuszczalnej natomiast poziom formy aktywnej był bardzo niski (na granicy detekcji) i nie ulegał znaczącym zmianom. Forma 76 kDa ulega tutaj prawdopodobnie dalszej degradacji, o czym mogą świadczyć pojawiające się we frakcji rozpuszczalnej immunoreaktywne prążki białka o wyższej ruchliwości elektroforetycznej (ok. 50 i 36 kDa). Bardzo słaba reakcja immunochemiczna tych białek uniemożliwia niestety przedstawienie pełnej dokumentacji.

Niedokrwienie trwające 5 minut prowadzi do szybkiej i względnie długotrwałej (do 72 godzin) aktywacji μ -kalpains, wyrażającej się podwyższeniem immunoreaktywności formy 76 kDa.

Lokalizacja subkomórkowa formy aktywnej świadczy, że miejscem aktywacji kalpains jest błona plazmatyczna.



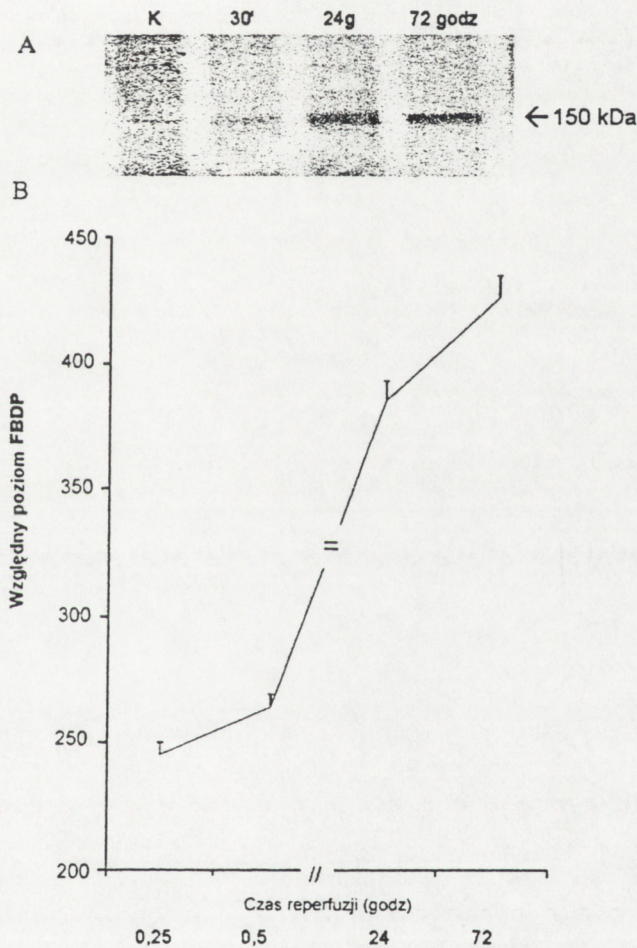
Ryc. 21. Wpływ niedokrwienia i reperfuzji na poziom aktywnej formy (76 kDa) μ -kalpajny w hipokampie mózgu chomika mongolskiego.

A) Reprezentatywny Western blot przedstawia immunoreaktywność 76 kDa formy μ -kalpajny w homogenacie hipokampa mózgu chomika mongolskiego w czasie ischemii i reperfuzji. Reakcję immunochemiczną prowadzono z przeciwciałem specyficznym dla formy aktywnej. Dla uwidocznienia reakcji stosowano metodę wzmocnionej chemiluminescencji. Kolejność ścieżek na immunoblocie odpowiada punktom czasowym zaznaczonym na osi odciętych wykresu B.

B) Względne poziomy białka aktywnej formy μ -kalpajny w homogenacie hipokampa otrzymane przy zastosowaniu ilościowej densytometrii wykonanych Western blotów. Wartości są średnimi \pm SD uzyskanymi w wyniku analizy trzech zwierząt w każdej grupie eksperymentalnej przy trzykrotnym powtórzeniu każdego z oznaczeń.

2.4. Proteoliza specyficznych substratów kalpain w hipokampie mózgu chomika mongolskiego

W celu weryfikacji wniosku o funkcjonalnej aktywacji kalpainsy w reperfundowanym hipokampie mózgu chomika mongolskiego, wykonano oznaczenie produktów proteolitycznego rozpadu dwóch specyficznych substratów tego enzymu: fodryny i kinazy białkowej C.



Ryc. 22. Przyrost produktów rozpadu fodryny w czasie reperfuzji w hipokampie mózgu chomika mongolskiego.

A) Western blot homogenatu hipokampa mózgu chomika mongolskiego wykonany przy użyciu przeciwciała skierowanego przeciwko 150 kDa produktowi rozpadu fodryny (ang. FBDP). Strzałka wskazuje pozycję białka o ruchliwości elektroforetycznej 150 kDa. B) Wyniki analizy densytometrycznej wykonanego immunoblotu, wyrażone jako wielokrotność poziomu FBDP znalezione w hipokampie mózgu zwierzęcia kontrolnego. Wartości są średnimi \pm SD z trzech eksperymentów przy trzykrotnym powtórzeniu każdego z oznaczeń.

2.4.1. Proteoliza fodryny

Ryc. 22 przedstawia densytometryczną analizę immunoreaktywności z przeciwciałem skierowanym przeciwko specyficznym dla proteolizy kalpainowej 150 kDa fragmentom białka fodryny.

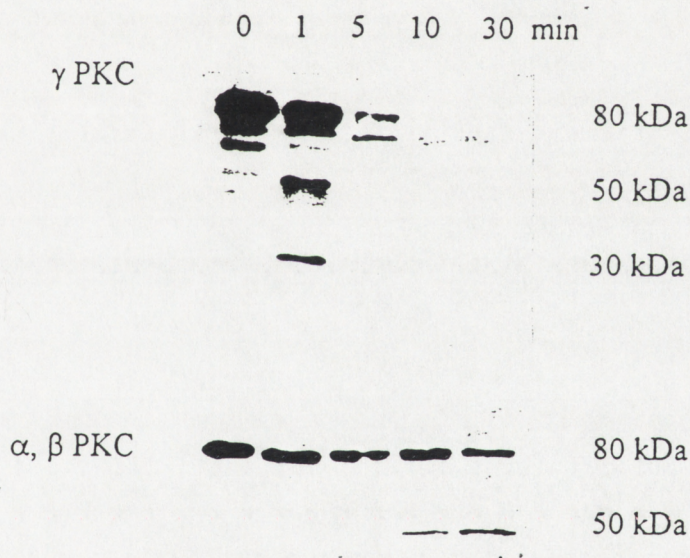
W warunkach fizjologicznych produkty rozpadu stanowią jedynie około 1% białka natywnego. Przyrost fragmentów proteolitycznych po niedokrwieniu ma charakter dwufazowy (ryc. 22 B). Faza wczesna, przypominająca obserwowaną w modelu ostrego niedokrwienia (ryc.18 A, ścieżka 4), występuje bezpośrednio po ischemii i w krótkim czasie (30 min) po przywróceniu krążenia. Natomiast faza późna pojawia się około 24 godzin po wprowadzeniu reperfuzji i manifestuje się bardziej dramatycznym wzrostem produktów rozpadu.

2.4.2. Proteoliza klasycznych izoform kinazy białkowej C (cPKC)

Aktywacja kalpain może prowadzić do ograniczonej proteolizy cPKC. Miarą proteolitycznego rozpadu cPKC jest wzrost formy 50kDa (PKM). Jest to katalityczna podjednostka enzymu, powstająca w wyniku proteolizy. Reakcję immunochemiczną przeprowadzono z przeciwciałami specyficznymi dla poszczególnych izoform cPKC: γ oraz α/β_2 , posiadającymi zdolność rozpoznawania również podjednostki katalitycznej - PKM.

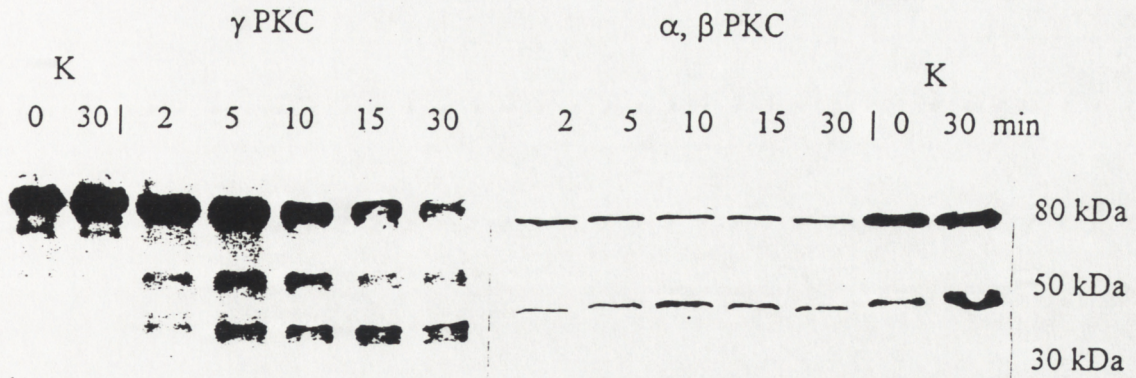
Wstępny etap badań wykonanych w układzie *in vitro* (na częściowo oczyszczonych enzymach) miał na celu określenie podatności izoform γ oraz α/β_2 na trawienie kalpainami. Wyniki wykazały, że cPKC jest lepszym substratem dla m-kalpainy w porównaniu z formą μ (ryc.23 vs ryc.24). Co więcej, obrazy immunochemicznej detekcji produktów proteolizy generowanych przez m-kalpainę wykazały różny stopień wrażliwości badanych izoform cPKC na trawienie stałą ilością enzymu proteolitycznego (ryc. 23). W przypadku γ PKC forma natywna (80 kDa) zanika już w pierwszej minucie inkubacji z m-kalpainą. W tym czasie pojawia się forma 50 kDa, reprezentująca PKM.

Proteoliza izoform α i β przy udziale m-kalpiny przebiega mniej dynamicznie. Czas inkubacji, prowadzący do całkowitego zaniku formy γ , nieznacznie tylko zmieniał poziom natywnych form izoenzymów α/β . Dłuższe trawienie proteazą powodowało dalszą degradację zarówno formy natywnej jak i obserwowanych wcześniej fragmentów proteolitycznych. Proteoliza cPKC wydaje się być procesem specyficznym dla wapniowo-zależnych proteaz, ponieważ zarówno dodanie do środowiska inkubacyjnego leupeptyny, inhibitora proteaz cysteinowych czy brak jonów Ca^{2+} w tym środowisku, hamował proces degradacji PKC *in vitro*.



Ryc. 23. Immunoblot przedstawiający podatność izoform cPKC na proteolizę m-kalpainą.

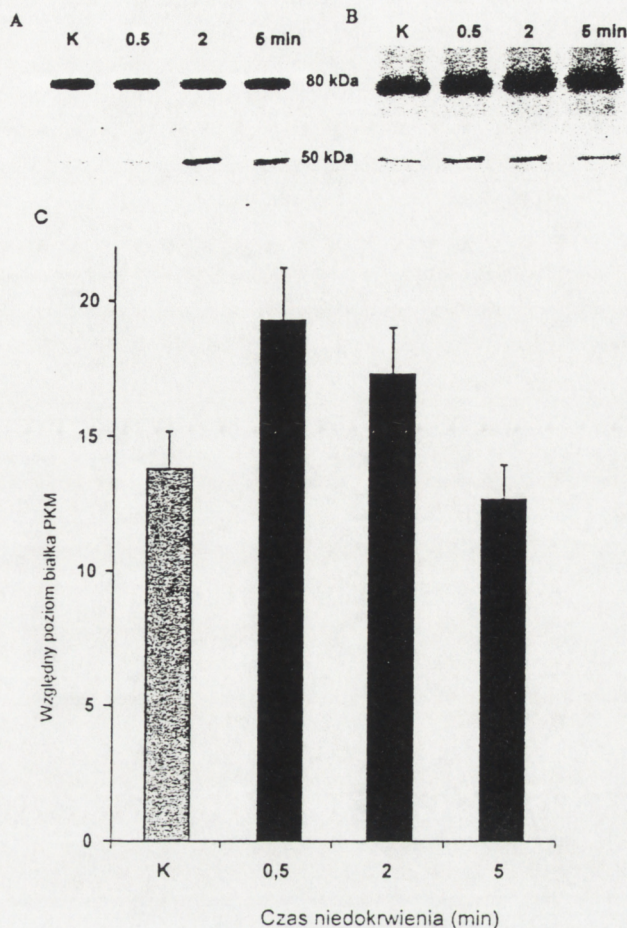
Częściowo oczyszczoną PKC (5 μg białka) inkubowano z m-kalpainą (0.7 U) w obecności 4 mM CaCl_2 w 30°C w czasie od 0 do 30 minut. Immunodetekcję prowadzono przy użyciu przeciwciał anti-PKC γ oraz anti-PKC α, β_2 .



Ryc. 24. Immunoblot przedstawiający podatność izoform cPKC na proteolizę μ -kalpainą.

Częściowo oczyszczoną PKC (5 μ g białka) inkubowano z μ -kalpainą (4 U) w obecności 1 mM CaCl_2 w 30°C w czasie od 0 do 30 minut. Immunodetekcję prowadzono przy użyciu przeciwciał anti-PKC γ oraz anti- PKC α , β_2 . K - kontrolna inkubacja, bez egzogennej kalpainy.

W następnym etapie badań prześledzono dynamikę proteolizy głównych izoform klasycznej PKC w mózgach zwierząt poddanych niedokrwieniu. Proteolityczny rozpad izoformy γ PKC z przejściowym wzrostem PKM o 40% w stosunku do kontroli, widoczny był już po 0.5 minutowym niedokrwieniu (ryc.25 B i C). Kinaza białkowa M ulegała natychmiastowej degradacji, tak że po 5 minutach niedokrwienia natężenie immunoreaktywności było równe kontrolnemu. Ten sam kierunek zmian poniedokrwienionych prezentowała forma α/β_2 , z tym jednak, że kinaza białkowa M pojawiała się nieco później, bo po 2 minutach niedokrwienia (ryc. 25 A). Opisane zmiany dotyczyły hipokampa i nie były obserwowane w korze mózgu.



Ryc. 25. Wpływ ischemii na indukcję PKM w hipokampie gerbila.

Immunobloty przedstawiają poziomy PKM generowane z formy alfa/beta cPKC (A) i gamma cPKC (B) w czasie ischemii trwającej 0.5 - 5 minut. (C) Poziom PKM indukowany z formy gamma PKC w czasie ischemii, przedstawiony w wartościach względnych (w stosunku do całkowitego poziomu gamma PKC).

Wartości zamieszczone na wykresie są średnimi \pm SD z trzech eksperymentów przy trzykrotnym powtórzeniu każdego z oznaczeń.

Badania dynamiki rozpadu specyficznych dla kalpain substratów in situ (fodryny i cPKC) potwierdziły aktywację procesu proteolizy kalpainowej w niedokrwionym i reperfundowanym hipokampie gerbila.

W badaniach in vitro izoenzymy PKC są łatwiej i bardziej specyficznie degradowane przez m-kalpainę aniżeli przez μ -kalpainę.

Izoforma γ PKC wydaje się być szybciej proteolizowana in vitro i in vivo (w czasie niedokrwienia mózgu) niż α/β_2 PKC.

Prezentowane wyniki potwierdzają udział wapniowo-zależnych enzymów proteolitycznych w łańcuchu zdarzeń indukowanych poischemicznym wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Istotnym elementem rozwoju zmian poniedokrwiennych mogłaby być przejściowa aktywacja kalpain, prowadząca do wzrostu proteolizy specyficznych substratów, po której następuje zahamowanie funkcjonalnej aktywności enzymu. W badanym przez nas modelu nieodwracalnego głębokiego niedokrwienia obniżenie całkowitej aktywności enzymatycznej wykazywała jedynie μ -kalpaina. Fakt ten pozostaje w zgodzie z obserwacją opisaną przez Nilsson i wsp. (1991) i wskazuje na większą wrażliwość tej izoformy na stres ischemiczny.

Drugą i tym razem wspólną dla obu izoform kalpain reakcją na niedokrwienie, zarówno głębokie (dekapitacja) jak i odwracalne o umiarkowanym stopniu nasilenia, było przemieszczenie białka i aktywności specyficznej enzymu z frakcji rozpuszczalnej do błon plazmatycznych. Równocześnie proporcjonalnie obniżała się ilość i aktywność specyficzna kalpain we frakcji rozpuszczalnej. Należy podkreślić, że wywołane trwającym 5 minut stresem ischemicznym przesunięcie kalpain do frakcji cząsteczkowej mózgu chomika mongolskiego ograniczone było jedynie do hipokampa i uwidocznione zostało jedynie metodą immunochemiczną. W korze przodomózgowia u tych samych zwierząt nie obserwowano zmian dystrybucji badanych proteaz. Można zatem przypuszczać, że translokacja enzymu do błon stanowi istotny etap rozwoju poischemicznych zmian degeneracyjnych w hipokampie, charakteryzujących się opóźnieniem występowania i wybiórczością do neuronów piramidowych CA1. Przesunięcie to, przy braku wyraźnych zmian w ilości białka enzymatycznego, świadczy o wzmożonej aktywacyjnej odpowiedzi kalpain hipokampa na niedokrwienia odwracalne.

Istnieje pełna zgodność, że asocjacja natywnych (80 kDa) kalpain z błoną plazmatyczną w obecności jonów wapnia jest warunkiem autolitycznego przekształcenia enzymu w formę aktywną (76 kDa), tzw. postautolityczną (Mellgren, 1987; Suzuki i wsp., 1988; Inomata i wsp., 1989). Wykazany w prezentowanej pracy wyraźny przyrost tej formy we frakcji błon bezpośrednio po ischemii i w czasie reperfuzji w hipokampie

świadczy o natychmiastowej i utrzymującej się tutaj do 72 godzin aktywacji kalpain.

Dodatkowym wskaźnikiem poischemicznej aktywacji kalpain były gromadzące się w tkance produkty rozpadu proteolitycznego dwóch wybranych specyficznych substratów kalpain: fodryny i klasycznych izoform kinazy białkowej C. Produkty degradacji pojawiały się w całym mózgu w głębokiej ischemii dekapitacyjnej szczura (produkty rozpadu fodryny) i hipokampie gerbila (produktu rozpadu fodryny i PKC) już w pierwszej minucie ischemii i rosły nadal w czasie reperfuzji, równolegle z przyrostem aktywnej formy μ -kalpainy.

Zgodnie z hipotezą, aktywna forma kalpainy istnieje tylko przejściowo i przy przedłużającej się ekspozycji na wapń ulega dalszej degradacji po uwolnieniu z błony, ograniczając tym samym aktywność proteolityczną *in vivo*. Indukowane ischemią i obserwowane na immunoblocie immunoreaktywne prążki o większej niż 76 kDa ruchliwości elektroforetycznej we frakcji rozpuszczalnej są prawdopodobnie produktami degradacji zaktywowanej uprzednio kalpainy.

Innym badaniem przez nas przypuszczalnym mechanizmem regulującym aktywność wapniowo-zależnego układu proteolitycznego była interakcja wewnątrzkomórkowa z endogennym inhibitorem-kalpastatyną (ryc. 17). Jedna cząsteczka kalpastatyny może hamować aktywność 3-4 molekuł kalpainy, w zależności od aktualnie występującej w komórce formy inhibitora (o wysokim lub niskim ciężarze molekularnym) (Emori i wsp., 1987; Maki i wsp., 1987). Wykazany w naszych badaniach niewielki poischemiczny wzrost aktywności kalpastatyny do 128% może mieć zatem duże znaczenie funkcjonalne, indukujące w ischemicznych neuronach stopniowe obniżenie aktywności kalpainy. Na podstawie przedstawionych badań nie możemy jednak stwierdzić, czy kalpastatyna inhibuje badane proteazy przed czy po autolizie, ponieważ działa zarówno na formę nieautolizowaną jak i na obecną w cytosolu formę autolizowaną kalpain (Kaprell i Goll 1989). Kalpastatyna ma bardzo wysokie powinowactwo do kalpainy w obecności wapnia i inhibicja ma charakter stechiometryczny (Maki et al. 1990). Zatem lokalny stosunek kalpainy do kalpastatyny w

komórkach jest ważnym czynnikiem, który określa rozmiar inhibicji, a tym samym proteolizy substratów kalpainowych *in vivo*.

Podsumowanie: Ischemia indukuje dwa różne lecz wzajemnie powiązane efekty na układ wapniowo-zależnej proteolizy, regulowanej przez kalpainy. Jednym z nich jest natychmiastowa aktywacja enzymów wyrażająca się wzrostem aktywności specyficznej m-kalpainy, przemieszczeniem kalpain do błon plazmatycznych, generacją formy post-autolitycznej i degradacją proteolityczną specyficznych dla kalpain substratów: cPKC i fodryny. Przewaga odpowiedzi aktywacyjnej kalpain wydaje się być specyficzna dla niedokrwienia odwracalnego.

Natomiast drugi efekt, nasilony w ischemii podekapitacyjnej u szczura, to obniżenie całkowitej aktywności specyficznej μ -kalpainy, wzrost degradacji formy post-autolitycznej i równoczesny wzrost aktywności kalpastatyny. Zdolność tkanki do utrzymania tych dwóch procesów, aktywacyjnego i inhibicyjnego, w równowadze może determinować wielkość i charakter uszkodzeń spowodowanych ischemią (np nekroza vs apoptoza).

Zaobserwowana selektywność aktywacji kalpain ograniczona do hipokampa w modelu przejściowej ischemii mózgu gerbila, sugeruje włączenie tej reakcji w łańcuch zdarzeń prowadzących do opóźnionej śmierci neuronów, występującej wybiórczo w tej strukturze mózgu.

DYSKUSJA

Jednymi z najbardziej preferowanych ewolucyjnie systemów przenoszenia informacji wewnątrzkomórkowej są reakcje fosforylacji/defosforylacji białek, regulowane aktywnością specyficznych kinaz i fosfataz. Nie mniej ważne wydają się być procesy ograniczonej proteolizy, prowadzące do aktywacji/dezaktywacji białek (tzw. sygnałowych), leżących na szlaku przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego. Enzymy te, włączone w transdukcję sygnałów, arbitralnie można podzielić na dwie podstawowe grupy. Jedna z nich obejmowałaby kinazy i proteazy aktywowane przez wtórne przekąźniki, wytwarzane w odpowiedzi na pobudzenie receptorów błonowych. Do drugiej grupy można włączyć kinazy i proteazy związane z łańcuchem przenoszenia sygnału wewnątrz komórki w kaskadzie wzajemnych powiązań (kaspazy, kaskada Ras/MAP kinazy itp).

Prezentowane badania dotyczyły kinaz serynowo/treoninowych, CaMKII i cPKC oraz proteaz - kalpain, należących do pierwszej grupy enzymów włączonych w przekąźnictwo sygnałów z receptorów błonowych. Uzyskane wyniki wskazują na pewną prawidłowość reakcji badanych enzymów na ischemię. Wpisuje się ona w ten sam podstawowy schemat, obejmujący krótkotrwałą aktywację/translokację, indukcję formy przejściowej, a następnie długo trwające obniżenie aktywności enzymatycznej.

Zgodnie z przedstawianymi wynikami, jednym z pierwszych następstw zablokowania dopływu krwi do mózgu jest natychmiastowa aktywacja zarówno badanych kinaz jak i proteaz w wyniku interakcji ze swoistymi aktywatorami oraz przekąźnikami drugiego rzędu (DAG, IP₃, CaM a przede wszystkim wapniem). Zaktywowane enzymy przemieszczają się z cytoplazmy do określonych rejonów błony plazmatycznej, jakimi są miejsca indukcji specyficznych modulatorów lub lokalizacji swoistych dla danego enzymu substratów. Proces translokacji zależy zarówno od rodzaju błon jak i od zmian, zachodzących w nich pod wpływem niedokrwienia. Może to być fosforylacja czy proteoliza innych białek lub też, jak w przypadku PKC, stała

obecność receptorów dla zaktywowanego enzymu, tzw. RACKs (Mochly-Rosen i wsp., 1991; Ron i wsp., 1994).

Eksperymenty przeprowadzone w ostatnich miesiącach i nie włączone do niniejszej monografii wskazują, że preferowanym miejscem natychmiastowej poischemicznej translokacji badanych kinaz (cPKC i CaMKII) są gęstości postsynaptyczne (PSD), struktury, gdzie znajdują się liczne białka receptorowe dla neuroprzekazników i kanały jonowe. Aktywacja CaMKII w tych strukturach jest warunkiem indukcji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP), jakkolwiek udział formy autonomicznej w tym procesie nie został wyjaśniony (Malenka i wsp. 1989). Interakcje CaMKII z innymi białkami tego przedziału synapsy, określane zależnym od stężenia wapnia stopniem ufosforylowania cząsteczki CaMKII, mogłyby pośredniczyć w przekazywaniu sygnału na dalsze elementy łańcucha postsynaptycznego poprzez reakcje fosforylacji (McNeil, Colbran, 1995).

W świetle uzyskanych wyników, translokacja białka do błon plazmatycznych jest z jednej strony niezbędnym warunkiem aktywacji kalpain czy kinazy białkowej C, z drugiej natomiast wydaje się być ona zbieżna z krótkotrwałą aktywacją a następnie inhibicją CaMKII. W tym przypadku asocjacja z błoną mogłaby zapobiegać szkodliwej hyperfosforylacji substratów cytosolowych przez uaktywnioną kinazę, a więc byłaby elementem mechanizmu protekcyjnego. Przeniesienie enzymu do specyficznych miejsc czy struktur błony alternatywnie mogłoby kompensować jego sukcesywną inhibicję występującą również w tym przedziale komórkowym w niedokrwieniu.

Zmiany aktywności katalitycznej badanych enzymów wywołane niedokrwieniem, obejmują dodatkowo przekształcenie samej ich cząsteczki i pojawienie się w efekcie przejściowych form autonomicznych, nie podlegających dłużej kontroli przez swoiste wtórne przekazy. Mechanizm generowania form autonomicznych jest różny i specyficzny dla poszczególnych enzymów. Przekształcenie białka kinazy C polega na proteolitycznym odcięciu 30-35 kDa fragmentu cząsteczki, pełniącego pierwotnie funkcję regulatorową. Zakres ograniczonej proteolizy cPKC znajduje się pod kontrolą

zależnych od wapnia proteaz - kalpain. Natomiast powstawanie autonomicznych form CaMKII wiąże się z autofosforylacją pojedynczego aminokwasu (tyrozyny w pozycji 286 łańcucha białkowego). Taka modyfikacja kowalencyjna własnego białka przez zaktywowaną uprzednio przez wapń kinazę, prowadzi do wzmocnienia i przedłużenia odpowiedzi na pierwotny sygnał, jakim jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Kończy się ona kontrolowaną przez specyficzne fosfatazy defosforylacją tyrozyny 286 lub też całym łańcuchem dalszych, tzw sekwencyjnych fosforylacji, również takich, które prowadzą do stopniowego wyłączenia aktywności enzymu.

W przypadku kalpain(y) nie dochodzi do powstania absolutnie autonomicznej formy enzymu. Niemniej również i tu proteaza ulega autolitycznemu przekształceniu, polegającemu na odcięciu krótkiego, 4 kDa fragmentu łańcucha białkowego, stając się aktywną już przy stosunkowo niskich, fizjologicznych stężeniach jej podstawowego aktywatora, jakim jest wapń (Suzuki i wsp., 1988; Cong i wsp., 1989; Edmunds i wsp., 1991).

Pomimo podobnego schematu bezpośredniej odpowiedzi na ischemię, zarówno mechanizmy aktywacji jak i hamowania poszczególnych enzymów znacznie się różnią. Podczas gdy warunkiem aktywacji CaMKII jest tylko obecność wapnia i kalmoduliny, w przypadku cPKC i kalpain, oprócz obecności specyficznych, niskocząsteczkowych aktywatorów, niezbędna wydaje się jeszcze asocjacja enzymów z błoną i ograniczona proteoliza. Podobnie różne są mechanizmy poischemicznej inhibicji, następującej po fazie aktywacyjnej. Obniżenie aktywności CaMKII wiąże się z patologiczną fosforylacją, przy zachowaniu stałej ilości jej cząsteczek. Natomiast główną przyczyną obniżenia aktywności PKC i kalpain jest ich dalsza proteoliza, co w konsekwencji prowadzi do spadku poziomu białka enzymatycznego.

Pewne szczególne cechy ischemicznej aktywacji/deaktywacji badanych enzymów w niedokrwieniu mózgu dla jasności wyводу będą omówione oddzielnie.

I tak aktywacja CaMKII wyraża się wzrostem aktywności formy autonomicznej we wczesnej fazie uszkodzenia ischemicznego, która następnie wraca do poziomu

kontrolnego. Odwracalność inhibicji jak i utrzymujący się stały poziom białka enzymatycznego CaM kinazy II w przebiegu przeprowadzonych eksperymentów, obserwowany zarówno w trakcie niedokrwienia jak i w okresie reperfuzji wskazuje, że głównym czynnikiem, determinującym zmiany aktywności katalitycznej, są tutaj prawdopodobnie kowalencyjne modyfikacje cząsteczki w reakcjach fosforylacji/defosforylacji. Podobny pogląd prezentują Taft i wsp.(1988) oraz Churn i wsp. (1992).

Opisywane przez niektórych badaczy obniżanie się ekspresji mRNA i białka CaMKII występowało jedynie w pewnych, odosobnionych rejonach hipokampa (Hu i wsp.,1995; Wieloch i wsp.,1991; Hiestand, Kindy, 1992; Babcock i wsp.,1995). Zarówno to, jak i opisana przez Aronowskiego i Grottę (1996) a potwierdzona przez nas (dane nie publikowane) translokacja do PSD, dopuszcza możliwość występowania nieznacznej degradacji proteolitycznej białka enzymatycznego (Rich i wsp.,1990), ograniczonej jedynie do określonych komórek czy struktur subkomórkowych. Uwzględniając znaczne różnice we wrażliwości na ischemię badanych przez nas struktur mózgu (kora przodomózgowia vs hipokamp), przy podobnej reakcji ze strony CaMKII możnaby sądzić, że jedynie te subtelne, nie uchwycone w naszych badaniach zmiany, byłyby patognomoniczne dla uszkodzenia ischemicznego, obserwowanego wybiórczo w hipokampie (Kirino, Sano, 1984).

Rola obserwowanej przez nas krótkotrwałej aktywacji kinazy CaMKII, jak i dramatycznego spadku jej aktywności całkowitej w obu badanych strukturach mózgu nie jest jasna. Aktywująca część odpowiedzi, związana z początkowym sygnałem wapniowym, miałaby analogiczny przebieg do obserwowanej w procesach fizjologicznej aktywacji przekąźnictwa nerwowego oraz przy pobudzeniu ekscytotoksycznym glutaminianem (Fukunaga i wsp., 1992; 1993; Yano i wsp., 1994). Czy natomiast inhibicja enzymu byłaby wpisana w program neuroprotekcji lub alternatywnie w dalszy proces neurodegeneracji jest sprawą kontrowersyjną. Obniżenie aktywności CaMKII mogłoby być wyznacznikiem obszaru objętego ischemią mózgu (Aronowski i wsp.,

1992), jakkolwiek w świetle naszych badań spadek aktywności CaMKII nie jest dobrym prognostą wystąpienia późnych zmian strukturalnych i utrwalonych zaburzeń neurologicznych. Poischemiczny powrót aktywności enzymu mógłby mieć natomiast zasadnicze znaczenie w podjęciu prawidłowych funkcji ośrodkowego układu nerwowego po niedokrwieniu. Temat ten będzie przedmiotem dalszej dyskusji.

Jak już wspomniano, mechanizmy odpowiedzialne za aktywację cPKC w niedokrwieniu, obok obecności swoistych aktywatorów i translokacji do błony, obejmują także ograniczoną proteolizę enzymu przez kalpainy. Interakcję pomiędzy PKC i kalpainą ułatwia prawdopodobnie szybka translokacja obu cząsteczek białkowych do błon plazmatycznych, a obecne w nich fosfolipidy wpływają pozytywnie na dalsze, wzajemne oddziaływanie obu enzymów poprzez modyfikację ich konformacji (Coolican, Hathaway, 1984; Osada i wsp., 1990).

Znaczenie proteolitycznej modyfikacji PKC w propagacji sygnału ischemicznego jest nadal przedmiotem licznych kontrowersji, spowodowanych zapewne znikomym, często niewykrywalnym poziomem PKM w warunkach fizjologicznych (Murray i wsp.; 1987). Wyraźny przyrost tej formy po odwracalnym niedokrwieniu obserwowany przez nas jedynie w hipokampie, sugeruje jej rolę w procesach prowadzących do opóźnionej śmierci neuronów, występującej wybiórczo w tej strukturze. Należałoby zaznaczyć, że zdolność rozpoznawania kinazy białkowej M ulega znacznemu obniżeniu, w miarę "starzenia się" przeciwciał, anti-cPKC, co może tłumaczyć negatywne wyniki niektórych autorów.

Badania wykonane w naszej pracowni wskazują na udział proteolizy kalpainowej w modulacji specyficznych dla kinazy białkowej C odpowiedzi fosforylacyjnych również w czasie stresu metabolicznego *in vitro* (dane niepublikowane). Innym potwierdzeniem aktywności funkcjonalnej PKM w przedziale postsynaptycznym jest wzrost wapniowo-niezależnej aktywności kinazowej z równoczesnym ubytkiem formy beta cPKC w hipokampie szczura po indukcji wzmocnienia synaptycznego (Suzuki i wsp., 1992). Według opartych jedynie na spekulacjach opiniach niektórych badaczy, właśnie forma

PKM odpowiada za długo trwające modyfikacje uwalniania neuroprzekazników (Malinow i wsp., 1988; Suzuki i wsp., 1992). Kinaza białkowa M istnieje tylko przejściowo, podlegając ścisłej regulacji, prawdopodobnie przez dalszą proteolizę. Badania prowadzone na komórkach neuroblastoma wskazują na udział kalpainy w proteolizie PKM indukowanej z izoformy PKC alfa (Shea i wsp., 1994; Cressman i wsp., 1995). Na podstawie dostępnych danych nie można jednak wykluczyć udziału innych proteaz.

Z badań *in vitro* przedstawionych w tej pracy wynika, że izoforma γ PKC jest lepszym substratem dla m-kalpainy aniżeli izoformy α/β_2 , a powstający przejściowo fragment proteolityczny PKM ulega dalszej degradacji. Degradację tę można przypisać zarówno kalpainie jak i obecności innych proteaz, zawartych w naszym, tylko częściowo oczyszczonym, preparacie PKC *in vitro*. Proteolizowana początkowo przez kalpainę kinaza białkowa C może stać się bardziej podatna na dalszą degradację przez te inne, bliżej nieokreślone proteazy.

Stopniowe, poaktywacyjne wyłączanie cPKC ze szlaku przekazywania bodźców wewnątrzkomórkowych (ang. down-regulation) jest obok jej translokacji prawdopodobnie zasadniczą komponentą regulatorową transdukcji sygnału ischemicznego. Jakkolwiek, jak już wspomniano wyżej, odpowiedzialność za "down-regulation" przypisuje się często kalpainom (Pontremoli i wsp., 1986, 1988; Zalewska, Domańska-Janik, 1990), nie można wykluczyć udziału innych mechanizmów takich jak np. defosforylacja enzymu (Yawin i wsp. 1995). Należy tutaj zaznaczyć, że opisana wyżej interakcja kalpain z kinazą białkową C nie ogranicza się jedynie do form zależnych od wapnia. Indukowanej przez kalpainę "down-regulation", z przejściowym pojawieniem się katalitycznego fragmentu cząsteczki w układzie *in vitro* (Eto i wsp. 1995) jak i *in vivo* (Ohno i wsp. 1991), podlega także izoforma epsilon (ϵ), należąca do n (niezależnych od wapnia) kinaz C. Można zatem wnioskować, że wszystkie izoformy PKC, posiadające podjednostkę regulatorową, mogą podlegać regulacji przez kalpainę a więc pośrednio także przez sygnał wapniowy.

Podkreślić należy, że poszczególne izoformy cPKC różnią się wrażliwością i dynamiką reakcji na bodziec ischemiczny. Wpływa to prawdopodobnie na odmiennosc ich funkcji w przekazywaniu sygnału ischemicznego, bądź odzwierciedla różną lokalizację subkomórkową tych izoenzymów w przedziałach o różnej podatności na niedokrwienie (Young III 1991). Zgodnie z danymi prezentowanymi w tej pracy, jak i publikowanymi wcześniej (Cardell i wsp.1990, Wieloch i wsp.1991, Zabłocka, 1997 - praca doktorska), szczególnie wrażliwą na niedokrwienie formą, która najszybciej ulega translokacji i proteolizie, jest γ PKC. Wrażliwość izoformy gamma koreluje z obniżoną ekspresją jej genu obserwowaną w ischemii, reperfuzji (Zabłocka i wsp., 1998) i we wczesnym okresie indukcji LTP w hipokampie (Thomas i wsp.,1994). Sugerowana neuronalna, postsynaptyczna lokalizacja gamma PKC może wskazywać na selektywność tego kompartmentu w transdukcji sygnału poischemicznego, prowadzącego do śmierci wrażliwych neuronów.

Jakkolwiek udział cPKC w reakcji poischemicznej mózgu nie budzi wątpliwości, nie jest jasne, która faza indukowanych nieokrwieniem zmian jest charakterystyczna dla rozwoju późnych uszkodzeń neuronów. Wyniki badań *in vitro*, mające na celu wyjaśnienie roli aktywacji lub inhibicji cPKC w rozwoju opóźnionych zmian neuronalnych są tak kontrowersyjne, że uniemożliwiają wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Przykład stanowią doniesienia Favaron i wsp. (1990) i Davis, Maher (1994).

Podczas gdy liczna grupa dowodów wskazuje, że aktywacja PKC hamuje apoptozę komórek pochodzenia neuronalnego *in vitro*, nie mniej liczna grupa danych wskazuje na wprost przeciwne działanie aktywacji PKC na proces apoptozy (Lucas, Sanchez-Margalet 1995).

Negatywny wpływ aktywacji kinaz białkowych może się wiązać ze zwiększeniem napływu wapnia do komórki, w wyniku fosforylacji zależnych od napięcia kanałów wapniowych (Hosey i wsp.1986, Boess i wsp.1990), jak i kanału związanego z receptorem NMDA (Chen i Huang 1992). Podobnie niekorzystny efekt miałby wzrost

uwalniania aminokwasów pobudzających z zakończeń presynaptycznych, w wyniku aktywacji PKC (Zablocka, Domańska 1994, 1996), prowadzący do nadmiernego pobudzenia receptorów i patologicznego wzmocnienia systemów generujących wtórne przekazywanie.

Z drugiej strony inaktywacja PKC, zachodząca prawdopodobnie jako odpowiedź na pierwotne pobudzenie enzymu, może hamować proces przywracania homeostazy komórkowej. Wiadomo na przykład, że usuwanie nadmiaru wapnia przez Ca^{2+} -ATPazę i wymiennik sodowo-wapniowy, jest regulowane pozytywnie przez PKC-zależną fosforylację (Nishizuka 1988).

Udział kinazy białkowej C w szerokim spektrum reakcji biochemicznych uniemożliwia precyzyjne ustalenie jej pozycji i roli w rozwoju zmian wywoływanych niedokrwieniem. Zarówno aktywacja, jak i inhibicja, występujące w konkretnym czasie po ischemii, mogą modulować szereg ważnych etapów transdukcji sygnału i wpływać na ostateczną odpowiedź komórki.

Wśród licznych publikacji, na uwagę zasługują interesujące dane uzyskane w naszej pracowni przez Zablocką i wsp.(1994a). Autorki wykazały, że wczesnej translokacji/aktywacji cPKC, w ostrej fazie ischemii, towarzyszy indukcja białek wiążących się do sekwencji nukleotydowej AP1, a różnorodne postępowanie neuroprotektoryjne prowadzi do równoległego obniżenia obu reakcji. Aktywację dimeru AP1 obserwowano także w całkowitym niedokrwieniu mózgu (Kiessling i wsp.,1993; Nowak i wsp.,1993), w następstwie wzmożonej ekspresji białek c-Fos i c-Jun, zaliczanych do produktów tak zwanych genów wczesnej odpowiedzi. Indukcja tych genów towarzyszy wzrostowi wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia (Kolch i wsp.,1993; Ohtani i wsp.,1995), tworząc istotny składnik ciągu reakcji w pobudzonych komórkach nerwowych (Tsuda i wsp.1996).

Kinaza C może też aktywować drogę sygnału dla MAP kinazy, poprzez bezpośrednią fosforylację jednej z kinaz aktywatorowych (Raf) (Ohtani i wsp.1995) oraz białka receptorowego, związanego z adhezją komórek i posiadającego aktywność kinazy tyrozynowej (FAK) (Siciliano i wsp., 1996).

Jednym z głównych mechanizmów aktywacji kalpain jest ich autoliza na błonach plazmatycznych. Prezentowane wyniki wskazują, że w przeciwieństwie do PKC i CaMKII, faza aktywacji kalpain w modelu ischemii odwracalnej u gerbila ma charakter /długotrwały (do 72 godzin) i może być istotnym elementem rozwoju opóźnionej neurodegeneracji w hipokampie. Hydroliza kalpainowa, aczkolwiek w zasadzie ma charakter ograniczony, to poprzez uwrażliwienie białka na inne proteazy może kontrolować jego ostateczny poziom w komórce. Nie wiadomo jednak, które z działań proteolitycznych, będących konsekwencją aktywacji kalpains, prowadzą do procesów degeneracyjnych.

Uwaga licznej grupy badaczy skupiła się na skutkach degradacji fodryny - głównego strukturalnego białka błony postsynaptycznej, które kontroluje zarówno kształt komórki jak i organizację lipidową i białkową błony (Siman i wsp., 1984; Lynch, Baudry, 1987; DelBuono i wsp., 1988; Srinivasan i wsp., 1988). Uwzględniając intramolekularne asocjacje fodryny (obejmujące m.in. neurofilamenty, aktyny, lipidy błon i inne komponenty cytoszkieletu oraz transbłonowe receptory adhezyjne) można postulować, że jej hydroliza jest częścią mechanizmu fizjologicznej bądź patologicznej reorganizacji cytoszkieletu (Kosower, Glaser, 1990). Późna, dominująca faza proteolizy fodryny, obserwowana w przebiegu naszych eksperymentów, wydaje się korelować czasowo z opóźnioną śmiercią neuronów. Ograniczenie tego procesu do hipokampa u gerbila lub rozprzestrzenienie się go w innych strukturach w przypadku głębokiej ischemii dekapitacyjnej wskazuje, że reprezentuje on terminalny etap destrukcji neuronów (Yokota i wsp., 1995; Rami i wsp., 1997). Inhibicja aktywności kalpains wydaje się być właściwą i często sugerowaną strategią terapeutyczną (Hong i wsp., 1994; Bartus i wsp., 1995a,b). Mając na uwadze, że w warunkach fizjologicznych kalpaina istnieje głównie w formie latentnej, czasowa inhibicja jej aktywności nie powinna powodować niekorzystnych efektów wtórnych.

Stosowane początkowo inhibitory (leupeptyna, E64c) zmniejszyły co prawda efekty poischemiczne, wyrażające się uszkodzeniem strukturalnym czy zwiększonym

poziomem produktów rozpadu substratów w układach *in vitro* i *in vivo* (Arai i wsp.,1990, Brorson i wsp.,1994), ale okazały się być wysoce niespecyficzne. W ostatniej dekadzie zsyntetyzowano szereg związków o wysokim powinowactwie i stopniu selektywności w stosunku do kalpain (CX216, AK275, AK295), nie wykazujących przy tym niekorzystnych działań ubocznych. Podstawowy problem stanowi natomiast niedostateczna penetracja tych związków do komórek nerwowych. Znaczący efekt protekcyjny osiągany był jedynie po podaniu domózgowym (Bartus i wsp.1994; Bartus i wsp.,1995b).

Problemy związane z brakiem wysokiej selektywności inhibitorów, również w stosunku do badanych kinaz białkowych, pojawiły się przy próbach interpretacji mechanizmów ich działania protekcyjnego. Inhibitor kinaz białkowych, staurosporyna, podana do rejonu CA1 hipokampa w znacznym stopniu zapobiegała śmierci komórek nerwowych po ischemii przejściowej u gerbila i szczura (Hara i wsp.,1990). Związek ten, początkowo uważany za selektywny inhibitor PKC, inhibuje też CaMKII (Yanagihara i wsp.1991), nie pozwalając na rozróżnienie, która z tych kinaz odgrywa decydującą rolę w procesach neurodegeneracji. Co więcej, związek ten jest znany jako działający proapoptotycznie w układach *in vitro* (Couldwell i wsp., 1994; Behrens i wsp.,1995). Podobną protekcję neuronów rejonu CA1 hipokampa uzyskano po podaniu HA 1077, inhibitora szerokiego spektrum kinaz zależnych od wapnia (Asano i wsp.,1991). Podanie tych samych inhibitorów w innych modelach ischemii np w modelu niedokrwienia rdzenia kręgowego, powodowało skutki wręcz przeciwne i przyspieszało rozwój zmian neuropatologicznych (Madden i wsp.,1991). Efekt stosowania inhibitorów z pewnością zależy od charakteru niedokrwienia i jednoznacznego ustalenia, który z etapów poischemicznych zmian aktywności katalitycznej (aktywacja czy deaktywacja) odpowiada za destrukcję tkanki nerwowej.

Wczesnej poischemicznej degradacji spektryny, występującej w wyniku aktywacji kalpain, przypisuje się udział w procesach związanych z uczeniem i pamięcią (Lynch, Baudry, 1984; Siman i wsp.,1987). Wiązane jest to z wykazaną zdolnością proteolizy

receptora AMPA (będącego również substratem dla CaMKII) i z przebudową składu jego podjednostek (Bi i wsp., 1994). Oprócz fodryny obserwowano także poischemiczną degradację innego białka cytoszkieletowego - MAP2 (Matesic, Lin, 1994, Pettigrew i wsp., 1996). Przy braku selektywnych inhibitorów dla kalpainy nie sposób wykluczyć udziału innych proteaz (Wang, Yuen 1994) w poischemicznej degradacji białek.

Z drugiej strony, opisane przez Yamashimę i wsp. (1996) przemieszczenie kalpain w kierunku błony lizosomalnej w czasie niedokrwienia sugeruje, że ich aktywacja w poischemicznym hipokampie może prowokować wakuolizację i rozerwanie błony z uwolnieniem całej gamy enzymów biodegradujących, takich jak proteazy, nukleazy, lipazy czy sulfatazy, zdolnych do powolnego uszkodzania normalnych struktur komórkowych w środowisku o obniżonym przez ischemię pH (Siesjö i wsp., 1993).

Nieodwracalny charakter modyfikacji proteolitycznej czyni ją atrakcyjnym modelem w tłumaczeniu indukcji długotrwałych zmian procesów wewnątrzkomórkowych w neurodegeneracji. Zgodnie z wynikami Hirai i wsp. (1991) sugeruje się, że kalpaina jest włączona w degradację czynników transkrypcyjnych tj c-jun i c-fos a zatem w regulację ekspresji genów, końcowego etapu transdukcji sygnału w komórce.

W przedstawionych badaniach wykazano, że dynamika poischemicznej reakcji badanych enzymów, z nasileniem fazy aktywacyjnej bądź inhibicyjnej, zależy od modelu niedokrwienia. Stosunkowo nie destruktywne, 5 minutowe niedokrwienie odwracalne, charakteryzuje się przewagą komponenty aktywacyjnej. Świadczy o tym utrzymująca się aktywność kalpain (do 72 godzin reperfuzji), indukcja formy konstytutywnej PKM i tendencja do zachowania aktywności PKC związanej z błonami. Co więcej, nawet w przypadku CaMKII, dominującej fazy inhibicji aktywności całkowitej enzymu towarzyszył początkowy wzrost a potem utrzymanie prawidłowego poziomu aktywności formy autonomicznej, zdolnej do przedłużenia sygnału wywołanego niedokrwieniem.

W modelu ischemii nieodwracalnej wręcz przeciwnie, dochodzi do nasilenia procesu inhibicyjnego, głównie w przypadku kinazy białkowej C i kalpain, ale nawet i

tutaj forma aktywna (autonomiczna) CaMKII zostaje zachowana na poziomie kontrolnym. Naszym zdaniem inhibicyjną fazę reakcji ze strony badanych enzymów można przypuszczalnie wiązać z mechanizmem śmierci nekrotycznej neuronów.

Jak już wspomniano, w odróżnieniu do reakcji PKC i kalpain, wywołane niedokrwieniem zmiany aktywności CaMKII w równym stopniu dotyczyły obu badanych struktur - kory przodomózgowia i hipokampa i nawet w modelu krótkotrwałej i odwracalnej ischemii u gerbila nie różniły się jakościowo od zmian obserwowanych w modelu ciężkiego niedokrwienia (cardiac arrest). Taki brak selektywności wydaje się być ważną, aczkolwiek negatywną obserwacją, podważającą rolę CaMKII w fenomenie poischemicznej opóźnionej śmierci neuronów, występującej wybiórczo w sektorze CA1 hipokampa w modelu ischemii odwracalnej.

Rosnąca ilość dowodów wskazuje natomiast na funkcjonalne znaczenie CaMKII w formowaniu pamięci w czasie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP), jako molekularnego modelu procesów pamięci i uczenia się (Lisman, 1994; Silva i wsp., 1992, 1992a). Wiadomo, że nawet krótka, 5 minutowa ischemia eksperymentalna u zwierząt czy cardiac arrest u ludzi, mogą prowadzić do czasowego ograniczenia zdolności przyswajania nowych informacji, z dobrym odtwarzaniem zachowań wyuczonych lub wiadomości poprzednio nabytych (tak zwane zespoły amnezyczne) (Zola-Morgan i wsp., 1986; Ohno i wsp., 1994). Pomimo braku dostatecznej wiedzy o specyficznym substracie fosforylowanym przez CaMKII w eksperymentalnym modelu pamięci LTP, przyjmuje się, że inhibicja aktywności katalitycznej tej kinazy może wywołać analogiczny do poischemicznego deficyt pamięci tak zwanej świeżej. Bezpośrednich dowodów dostarczyły badania na zwierzętach transgenicznym (Lisman 1994). Dwie dodatkowe ważne obserwacje, poczynione w ostatnich latach, a mianowicie zdolność endogennej CaMKII do fosforylacji receptora AMPA *in vitro* (McGlade-McCulloh i wsp., 1993; Tan i wsp., 1994) oraz wzmocnienie odpowiedzi na kwas kainowy po infuzji konstytutywnie aktywnej kinazy II do neuronów hipokampa (McGlade-McCulloh i wsp., 1993), prowadzą do spekulacji, że to właśnie receptor

AMPA może być domniemanym fizjologicznym substratem postsynaptycznego działania CaMKII.

Przejęciowa aktywacja enzymu, stymulowana napływem wapnia, mogłaby być odpowiedzialna za fosforylację/up-regulację receptora AMPA. Natomiast następująca po aktywacji inhibicja całkowitej aktywności CaMKII pełniłaby rolę mechanizmu autoregulacyjnego, chroniącego receptor przed długotrwałą, niespecyficzną hyperaktywacją, nawet kosztem czasowego wyłączenia głównej funkcji w procesach formowania pamięci świeżej.

Naturalnie, zmiany zależnych od wapnia kinaz i proteaz są tylko niewielkim fragmentem całego łańcucha reakcji, prowadzących do trwałych uszkodzeń mózgu związanych z niedokrwieniem, niemniej wydają się niezbędne do inicjacji tego procesu patologicznego.

WNIOSKI

1. Badane kinazy serynowo/treoninowe: PKC i CaMKII oraz proteazy - kalpains reagują na stres ischemiczny według tego samego schematu : wywołana niedokrwieniem natychmiastowa aktywacja zostaje następnie zastąpiona obniżeniem aktywności enzymatycznej.
2. Mechanizmy molekularne i czas trwania fazy aktywacyjnej i inhibicyjnej są różne dla poszczególnych enzymów i obejmują:
 - ' asocjację z błoną plazmatyczną
 - " (auto)fosforylację/defosforylację
 - ''' ograniczoną proteolizę
3. Nieodwracalne niedokrwienie mózgu charakteryzuje się większym nasileniem procesu inhibicyjnego, natomiast w niedokrwieniu odwracalnym odnotowuje się przewagę komponenty aktywacyjnej badanych enzymów. Zjawisko to może się wiązać z różnymi mechanizmami śmierci neuronów, przeważającymi w poszczególnych modelach eksperymentalnych (nekroza vs apoptoza).

STRESZCZENIE

W prezentowanej pracy podjęto kwestię wyjaśnienia roli zależnych od wapnia kinaz PKC i CaMKII oraz proteaz - kalpain w przebiegu poischemicznego uszkodzenia neuronów mózgu. Przebadano aktywności i lokalizację wewnątrzkomórkową wspomnianych enzymów w dwóch modelach niedokrwienia mózgu, reprezentujących dwa różne typy uszkodzenia poischemicznego: w nieodwracalnym i przejściowym niedokrwieniu oraz w różnym czasie reperfuzji. Modelem nieodwracalnego niedokrwienia była ischemia podekapitacyjna lub ischemia wywołana zatrzymaniem akcji serca (cardiac arrest), prowadzące do nekrozy tkanki nerwowej. Ischemię przejściową, prowadzącą do progresywnego uszkodzenia neuronalnego głównie w hipokampie, wywoływano podwiązaniem tętnic szyjnych wspólnych u gerbila na okres pięciu minut. Zmiany aktywności kinaz i proteaz, zaobserwowane w przedłużonym procesie poischemicznej indukcji śmierci komórki, porównano z tymi, które towarzyszą zmianom nekrotycznym.

Uzyskane wyniki wskazują na pewną prawidłowość reakcji badanych enzymów na niedokrwienie. Składa się na nią natychmiastowa aktywacja/translokacja, indukcja formy przejściowej a następnie obniżenie aktywności enzymatycznej. Pomimo podobnego schematu bezpośredniej odpowiedzi badanych kinaz i proteaz na ischemię, zarówno mechanizmy jak i czas trwania fazy aktywacyjnej i inhibicyjnej są różne dla poszczególnych enzymów i zależą od modelu niedokrwienia. Na przykład, warunkiem aktywacji CaMKII jest tylko obecność wapnia i kalmoduliny, natomiast aktywacja cPKC i kalpain oprócz obecności aktywatorów wymaga jeszcze asocjacji enzymów z błoną i ograniczonej proteolizy. Wykazana w naszych eksperymentach aktywacja CaMKII, wyrażająca się przejściowym wzrostem autonomicznej formy enzymu, widoczna jest jedynie w czasie 0.5 - 2 minut ischemii, podczas gdy aktywacja kalpain ma charakter długotrwały i utrzymuje się do 72 godzin po przywróceniu krążenia.

Wywołane niedokrwieniem zmiany aktywności katalitycznej badanych enzymów obejmują dodatkowo przekształcenie samego białka enzymatycznego i pojawienie się przejściowych, autonomicznych form enzymu, nie podlegających kontroli przez wtórne przekąźniki. Mechanizm generowania form autonomicznych jest różny i specyficzny dla poszczególnych enzymów. Podczas gdy indukcja autonomicznej formy kinazy białkowej C, zwanej kinazą M (PKM), ma miejsce na drodze ograniczonej proteolizy przy udziale kalpain, powstanie autonomicznej formy CaMKII wiąże się z autofosforylacją pojedynczego aminokwasu. W przypadku kalpainy natomiast nie dochodzi do powstania absolutnie autonomicznej formy enzymu, jakkolwiek ulega ona autolitycznemu przekształceniu, zwiększającemu znacznie powinowactwo enzymu do wapnia.

Podobnie różne są mechanizmy poischemicznej inhibicji, jaka następuje po fazie aktywacyjnej. Obniżenie aktywności CaMKII wiąże się z patologiczną fosforylacją cząsteczki białka, natomiast spadek aktywności cPKC i kalpain jest wynikiem proteolitycznej degradacji. Należy zaznaczyć, że poszczególne izoformy cPKC różnią się dynamiką zmian poischemicznych. Szczególnie wrażliwą wydaje się być forma gamma PKC, ulegająca najszybciej translokacji i proteolizie. Sugerowana neuronalna postsynaptyczna lokalizacja gamma PKC może wskazywać na selektywność tego kompartmentu w procesie transdukcji sygnału poischemicznego, prowadzącego do śmierci neuronów.

W przedstawionych badaniach wykazano, że dynamika poischemicznej reakcji badanych enzymów, z nasileniem fazy aktywacyjnej lub inhibicyjnej, zależy od modelu niedokrwienia. Trwające 5 minut niedokrwienie odwracalne charakteryzuje się przewagą komponenty aktywacyjnej. Świadczy o tym utrzymująca się aktywność kalpain (do 72 godzin reperfuzji), indukcja formy konstytutywnej PKM i tendencja do zachowania aktywności związanej z błonami. Ponadto nawet w przypadku CaMKII, dominującej fazy inhibicji aktywności całkowitej enzymu towarzyszył początkowy wzrost a potem utrzymanie prawidłowego poziomu aktywności formy autonomicznej, zdolnej do przedłużenia sygnału wywołanego niedokrwieniem.

W modelu ischemii nieodwracalnej wręcz przeciwnie, dochodzi do nasilenia procesu inhibicyjnego, głównie w przypadku kinazy białkowej C i kalpain, ale nawet i tutaj forma aktywna (autonomiczna) CaMKII zostaje zachowana na poziomie kontrolnym. Inhibicyjną fazę reakcji można by wiązać z mechanizmem nekrotycznej śmierci neuronów, podczas gdy faza aktywacyjna mogłaby być charakterystyczna dla procesu apoptozy.

Należy jeszcze zaznaczyć, że w odróżnieniu do reakcji PKC i kalpain, wywołane niedokrwieniem zmiany aktywności CaMKII w równym stopniu dotyczyły obu badanych struktur - kory przodomózgowia i hipokampa i nawet w modelu krótkotrwałej i odwracalnej ischemii u gerbila nie różniły się jakościowo od zmian obserwowanych w modelu głębokiego niedokrwienia (cardiac arrest). Taki brak selektywności wydaje się być ważną, aczkolwiek negatywną obserwacją, świadczącą przeciw udziałowi CaMKII w fenomenie poischemicznej opóźnionej śmierci neuronów, występującej wybiórczo we wrażliwych strukturach hipokampa.

Z topografią rozwoju opóźnionych zmian w strukturach mózgu po odwracalnym, krótkotrwałym niedokrwieniu korelują dobrze zmiany aktywności kinazy białkowej C i kalpain. Enzymy te wydają się stanowić jedno z pierwszych ogniw przekazywania patologicznego sygnału, wpływając na poszczególne etapy ciągle nie zidentyfikowanego szlaku przekazywania, prowadzącego do opóźnionej neurodegeneracji.

PIŚMIENNICTWO

- Adachi Y., Ishida-Takahashi A., Takahashi C., Takano E., Murachi T., Hatanaka M. (1991) Phosphorylation and subcellular distribution of calpastatin in human hematopoietic system cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 3968-3972.
- Al Z., Cohen C.M. (1993) Phorbol 12-myristate 13-acetate-stimulated phosphorylation of erythrocyte membrane skeletal proteins is blocked by calpain inhibitors: possible role of protein kinase M. *Biochem. J.* **296**, 675-683.
- Ankarcrona M., Dypbukt J.M., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S., Lipton S.A., Nicotera P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of neurons or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* **15**, 961-973.
- Arai A., Kessler M., Lee K., Lynch G. (1990) Calpain inhibitors improve the recovery of synaptic transmission from hypoxia in hippocampal slices. *Brain Res.* **532**, 63-68.
- Arai H., Passonneau J.V., Lust W.D. (1986) Energy metabolism in delayed neuronal death of CA1 neurons of the hippocampus following transient ischemia in the gerbil. *Metabol. Brain Dis.* **1**, 263-278.
- Aronowski J., Grotta J.C. (1996) Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in postsynaptic densities after reversible cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* **709**, 103-110.
- Aronowski J., Grotta J.C., Waxham M.N. (1992) Ischemia-induced translocation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. Potential role in neuronal degeneration. *J. Neurochem.* **58**, 1743-1753.
- Arthur J.S.C., Crawford C. (1996) Investigation of the interaction of m-calpain with phospholipids : calpain – phospholipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1293**, 201-206.
- Asano T., Ikegaki I., Satoh S., Mochizuki D., Hidaka G., Suzuki Y., Shibuya M., Sugita K. (1991) Blockage of intracellular actions of calcium may protect against ischemic damage to the gerbil brain. *Br. J. Pharmacol.* **103**, 1935-1938.
- Atkinson J.L., Richtand N., Schworer C., Kuczenski R., Soderling T.R. (1987) Phosphorylation of purified rat striatal tyrosine hydroxylase by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II : Effect of an activator protein. *J. Neurochem.* **49**, 1241-1249.
- Azzi A., Boscoboinik D., Hensey C. (1992) The protein kinase C and protein kinase C related gene families. *Europ. J. Biochem.* **208**, 547-557.
- Babcock A.M., Liu H., Paden C.M., Edmo D., Popper P., Micevych P.E. (1995) Cerebral ischemia decreases calcium/calmodulin-dependent protein kinase II immunoreactivity, but no mRNA levels in the gerbil hippocampus. *Brain Res.* **705**, 307-314.

- Bading H., Ginty D.D., Greenberg M.E. (1993) Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* **260**, 181-186.
- Banik N.L., Chakrabarti A.K., Hogan E.L. (1992) Role of calcium-activated neutral protease in myelin. The role and function. In: Martenson R.E. (ed): "Myelin, Biology and Chemistry" Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 571-598.
- Banik N.L., DeVries G.H., Neuberger T., Russell T., Chakrabarti A.K., Hogan E.L. (1991) Calcium-activated neutral proteinase (CANP; calpain) activity in Schwann cells: immunofluorescence localization and compartmentation of μ - and m-CANP. *J. Neurosci. Res.* **29**, 346-354.
- Bartus R.T., Baker K.L., Heiser A.D., Sawyer S.D., Dean R.L., Elliott P.J., Straub J.A. (1994) Postischemic administration of AK275, a calpain inhibitor, provides substantial protection against focal ischemic brain damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **14**, 537-544.
- Bartus R.T., Dean R.L., Cavanough K., Eveleth D., Carriero D.L., Lynch G (1995a) Time-related neuronal changes following middle cerebral artery occlusion : implications for therapeutic intervention and the role of calpain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **15**, 969-979.
- Bartus R.T., Elliott P.J., Hayward N.J., Dean R.L., Harbeson S., Straub J.A., Li Z., Powers J.C. (1995b) Calpain as a novel target for treating acute neurodegenerative disorders. *Neurol. Res.* **17**, 249-258.
- Bazzi M., Nelsestuen G.L. (1991) Highly sequential binding of protein kinase C and related protein to membranes. *Biochem.* **30**, 7970-7977.
- Behrens M.M., Martinez J.L., Moratilla C., Renart J. (1995) Apoptosis induced by protein kinase C inhibition in a neuroblastoma cell line. *Cell Growth Differ.* **6**, 1375-1380.
- Benson D.L., Gal C.M., Isackson P.J. (1992) Dendritic localization of type II calcium calmodulin-dependent protein kinase mRNA in normal and reinnervated rat hippocampus. *Neuroscience* **46**, 851-857.
- Benson D.L., Isackson P.J., Gall C.M., Jones E.G. (1992a) Contrasting patterns in the localization of glutamic acid decarboxylase and Ca^{2+} /calmodulin - protein kinase gene expression in the rat central nervous system. *Neuroscience* **46**, 825-849.
- Benveniste H., Drejer J., Schousboe A., Diemer R.H. (1984) Elevation of extracellular concentration of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral dialysis. *J. Neurochem.* **43**, 369-374.
- Berti P.J., Storer A.C. (1995) Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J. Mol. Biol.* **246**, 273-283.

- Bi X., Tocco G., Baudry M (1994) Calpain-mediated regulation of AMPA receptors in adult brain. *NeuroReport* **6**, 61-64.
- Blomgren K., Nilsson E., Karlsson J.-O. (1989) Calpain and calpastatin levels in different organs of the rabbit. *Comp. Biochem. Physiol.* **93B**, 403-407.
- Boess F.G., Balasubramanian M.K., Brammer M.J., Campbell I.C. (1990) Stimulation of muscarinic acetylcholine receptors increases synaptosomal free calcium concentration by protein kinase-dependent opening of L-type calcium channels. *J. Neurochem.* **55**, 230-236.
- Bonfoco E., Krainc D., Anakarcrona M., Nicotera P., Lipton S.A. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7162-7166.
- Borner C., Filipuzzi I., Wartmann M., Eppenberger U., Fabbro D. (1989) Biosynthesis and posttranslational modifications of protein kinase C in human breast cancer cells. *J.Biol.Chem.* **264**, 13902-13909.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Braun A.P., Schulman H. (1995) The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 417-445.
- Bredesen D.E. (1995) Neural apoptosis. *Ann. Neurol.* **38**, 839-851.
- Bronstein J.M., Farber D.B., Wasterlain C.G. (1993) Regulation of type-II calmodulin kinase: functional implications. *Brain Res. Rev.* **18**, 135-147.
- Brorson J.R., Manzolilo P.A., Miller R.L. (1994) Ca^{2+} entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* **14**, 187-197.
- Burns D.J., Bell R.M. (1992) Lipid regulation of protein kinase C. In: Protein kinase C-current concepts and future perspectives (Ed. D.S. Lester i R.M. Epand) Ellis Horwood Ltd., New York p. 25-40.
- Busto R., Globus M.Y.-T., Neary J.T., Ginsberg M.D. (1994) Regional alterations of protein kinase C activity following transient cerebral ischemia: effects of intransischemic brain temperature modulation. *J. Neurochem.* **63**, 1095-1103.
- Cardell M., Bingren H., Wieloch T., Zivin J, Saitoh T. (1990) Protein kinase C is translocated to cell membranes during cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* **119**, 228-232.
- Cardell M., Boris-Möller F., Wieloch T. (1991) Hypothermia prevents the ischemia-induced translocation and inhibition of protein kinase C in the rat striatum. *J. Neurochem.* **57**, 1814-1817.

- Cardell M., Wieloch T. (1993) Time course of the translocation and inhibition of protein kinase C during complete cerebral ischemia in the rat. *J. Neurochem.* **61**, 1308-1314.
- Chakrabarti A.K., Neuberger T., Russell T., Banik N.L. (1997) Immunolocalization of cytoplasmic and myelin m calpain in transfected Schwann cells: II. Effect of withdrawal of growth factors. *J. Neurosci. Res.* **47**, 609-616.
- Chapman P.F., Frenquelli B.G., Smith A., Chen C.-M., Silva A.J. (1995) The alpha-calcium-calmodulin kinase II: A bidirectional modulator of pre-synaptic activity. *Neuron* **14**, 591-597.
- Chen L., Huang L.-Y.M. (1992) Protein kinase C reduces Mg^{2+} block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* **356**, 521-523.
- Chen S.-J., Sweatt J.D., Klann E. (1997) Enhanced phosphorylation of the postsynaptic protein kinase C substrate RC3/neurogranin during long-term potentiation. *Brain Res.* **749**, 181-187.
- Choi D.W. (1988) Calcium mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemia damage. *Trends. Neurosci.* **11**, 465-469.
- Choi D.W. (1992) Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* **23**, 1261-1276.
- Choi D.W. (1994) Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **747**, 162-171.
- Choi D.W. (1995) Calcium: still center stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* **18**, 58-60.
- Choi D.W. (1996) Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 667-672.
- Churn S.B., Sankaran B., Haley B.E., DeLorenzo R.J. (1993) Ischemic brain injury selectively alters ATP binding of calcium and calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 943-940.
- Churn S.B., Taft W.C., Billingsley M.S., Blair R.E., DeLorenzo R.J. (1990) Temperature modulation of ischemic neuronal death and inhibition of calcium/calmodulin-dependent kinase II in gerbils. *Stroke* **21**, 1715-1721.
- Churn S.B., Taft W.C., Billingsley M.S., Sankaran B., DeLorenzo R.J. (1992) Global forebrain ischemia induces a post-translational modification of multifunctional calcium and calmodulin-dependent kinase II. *J. Neurochem.* **59**, 1221-1232.
- Churn S.B., Taft W.C., De Lorenzo R.J. (1990a) Effects of ischemia on multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II in the gerbil. *Stroke* **21** (suppl. III) 112-116.

- Colbran R.J., Soderling T.R. (1990) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Curr. Topics Cell Regul.* **31**, 181-221.
- Collins R.C., Dobkin B.H., Choi D. (1989) Selective vulnerability of the brain: new insight into the pathophysiology of stroke. *Ann. Internal. Med.* **110**, 992-1000.
- Cong J.-Y., Goll D.E., Peterson A.M., Kapprell H.-P. (1989) The role of autolysis in activity of the Ca^{2+} -dependent proteinases (μ -calpain and m-calpain). *J. Biol. Chem.* **264**, 10096-10103.
- Coolican S.A., Hathaway D.R. (1984), Effect of L- α -phosphatidylinositol on a vascular smooth muscle Ca^{2+} -dependent protease. *J. Biol. Chem.* **259**, 11627-11630.
- Couldwell W.T., Hinton D.R., He S., Chen T.C., Sebat J., Weiss M.H., Law R.E. (1994) Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines. *FEBS Lett.* **345**, 43-46.
- Cressman C.M., Mohan P.S., Nixon R.A., Shea T.B. (1995) Proteolysis of protein kinase C: mM and μ M-requiring calpains have different abilities to generate and degrade, the free catalytic subunit, protein kinase M. *FEBS Lett.* **367**, 223-227.
- Croall D.E., DeMartino G.N. (1990) Regulation of calcium-dependent protease activity in vitro. In: Nellgren R.L., Murachi T. (eds) "Intracellular calcium-dependent proteolysis" Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 103-114.
- Croall D.E., De Martino G.N. (1991) Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function and regulation. *Physiol. Rev.* **71**, 813-847.
- Crumrine R.C., Dubyak G., LaManna J.C. (1990) Decreased protein kinase C activity during cerebral ischemia and after reperfusion in the adult rat. *J. Neurochem.* **55**, 2001-2007.
- Cruzalegui F.H., Kapiloff M.S., Morfin J.P., Kemp B.E., Rosenfeld M.G., Means A.R. (1992) Regulation of intrasteric inhibition of the multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 12127-12131.
- Dash P.K., Karl K.A., Colicos M.A., Prywes R., Kandel E.R. (1991) cAMP response element-binding protein is activated by Ca^{2+} /calmodulin as well as cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5061-5065.
- Davis J.B., Maher P. (1994) Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* **652**, 169-173.
- DeGraan P.N.E., Oestreicher A.B., Schotman P., Schrama L.H. (1991) Protein kinase C substrate B-50 (GAP-43) and neurotransmitter release. *Prog. Brain Res.* **89**, 187-207.
- DelBuono B.J., Williamson P.L., Schlegel R.A. (1988) Relation between the organization of spectrin and of membrane lipids in lymphocytes. *J. Cell. Biol.* **106**, 697-703.

- Deshpande R.V., Goust J.M., Hogan E.L., Banik N.L. (1995) Calpain secreted from activated lymphoid cells degrades myelin. *J. Neurosci. Res.* **42**, 259-265.
- Domańska-Janik K., Łazarewicz J., Noremberg K., Strosznajder J., Zalewska T. (1985) Metabolic disturbances of synaptosomes isolated from ischemic gerbil brain. *Neurochem. Res.* **10**, 573-589.
- Domańska-Janik K., Zabłocka B. (1993) Protein Kinase C as an Early and Sensitive Marker of Ischemia-Induced Progressive Neuronal Damage in Gerbil Hippocampus. *Mol. Chem. Neuropathol.* **20**, 111-123.
- Domańska-Janik K., Zalewska T. (1992) Effect of brain ischemia on protein kinase C. *J. Neurochem.* **58**, 1432-1439.
- Dosemeci A., Choi C. (1997) Ca^{2+} -independent autophosphorylation of postsynaptic density-associated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *Neurochem. Res.* **22**, 1151-1157.
- Durkin J.P., Tremblay R., Buchan A., Blosser J., Chakravarthy B., Mealing G., Morley P., Song D. (1996) An early loss in membrane protein kinase C activity precedes the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J. Neurochem.* **66**, 951-962.
- Durkin J.P., Tremblay R., Chakravarthy B., Mealing G., Morley P., Smoll D., Song D. (1997) Evidence that the early loss of membrane protein kinase C is a necessary step in the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J. Neurochem.* **68**, 1400-1412.
- Dutill E.M., Keranen L.M., De Paoli-Roach A.A., Newton A.C. (1994) In vivo regulation of protein kinase C by transphosphorylation followed by autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* **269**, 29359-29362.
- Edmunds T., Nagainis P.A., Sathe S.K., Thompson V.F., Goll D.E. (1991) Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of μ - and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **1077**, 197-208.
- Emori Y., Kawasaki H., Imajoh S., Imahori K., Suzuki K. (1987). Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3590-3594.
- Erondy N.E., Kennedy M.B. (1985) Regional distribution of type II Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. *J. Neurosci.* **5**, 3270-3277.
- Eto A., Akita Y., Saido T.C., Suzuki K., Kawashima S. (1995) The role of the calpain-calpastatin system in thyrotropin-releasing hormone-induced selective down-regulation of a protein kinase C isozyme, α -nPKC in rat pituitary GH₄C₁ cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 25115-25120.

- Favaron M., Manev H., Siman R., Bertolina M., Szekely A.M., DeErasquin G., Guidotti A., Costa E. (1990) Down-regulation of protein kinase C protects cerebellar granule neurons in primary culture from glutamate-induced neuronal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1983-1987.
- Flindt A., Paladini R.D., Koshland D.E.Jr. (1990) Autophosphorylation of protein kinase C at three separated regions of its primary sequence. *Science* **249**, 408-410.
- Fukuda T., Adachi E., Kawashima S., Yoshiya I., Hashimoto P.H. (1990) Immunohistochemical distribution of calcium-activated neutral proteinases and endogenous CANP inhibitor in the rabbit hippocampus. *J. Comp. Neurol.* **302**, 100-109.
- Fukunaga K., Rich D.P., Soderling T.T. (1989) Generation of the Ca^{2+} -independent form of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in cerebellar granular cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 21830-21836.
- Fukunaga K., Soderling T.R., Miyamoto E. (1992) Activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C by glutamate in cultured rat hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **267**, 22527-22533.
- Fukunaga K., Goto S., Miyamoto E. (1988) Immunohistochemical localization of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in rat brain. *J. Neurochem.* **51**, 1070-1078.
- Fukunaga K., Stoppini L., Miyamoto E., Muller D. (1993) Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* **268**, 7863-7867.
- Gajkowska B., Domańska-Janik K., Viron A. (1994) Protein kinase C-like immunoreactivity in gerbil hippocampus after a transient cerebral ischemia. *Folia Histochem. Cytobiol.* **32**, 71-77.
- Gill R., Andinč P., Hillered L., Person L., Hagberg H. (1992) The effect of MK-801 in cortical spreading depression in the penumbral zone following focal ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **12**, 371-379.
- Gispen W.H., Leunissen L.M., Oestreicher A.B., Verkleij A.J., Zwiers H. (1985) Presynaptic localization of B-50 phosphoprotein: the ACTH-sensitive protein kinase substrate involved in rat brain phosphoinositide metabolism. *Brain Res.* **328**, 381-385.
- Goldberg M., Steinberg S.F. (1996) Tissue-specific development regulation of protein kinase C isoforms. *Biochem. Pharmacol.* **51**, 1089-1093.
- Goldenring J.R., Casanova J.E., DeLorenzo R.J. (1984) Tubulin-associated calmodulin-dependent kinase evidence for an endogenous complex of tubulin with a calcium-calmodulin-dependent kinase. *J. Neurochem.* **43**, 1669-1679.

- Goldenring J.R., McGuire J.S., DeLorenzo R.J. (1984a) Identification of the major postsynaptic density protein as homologous with the major calmodulin-binding subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. *J. Neurochem.* **42**, 1077-1084.
- Goll D.E., Thompson V.F., Taylor R.G., Zalewska T. (1992) Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *BioEssays* **14**, 549-556.
- Gopalakrishna R., Barsky S.H. (1986) Hydrophobic association of calpains with subcellular organelles. Compartmentalization of calpains and the endogenous inhibitor calpastatin in tissues. *J. Biol. Chem.* **261**, 13936-13942.
- Gorelick F.S., Wang J.K.T., Lai Y., Nairn A.C., Greengard P. (1988) Autophosphorylation and activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in intact nerve terminals. *J. Biol. Chem.* **263**, 17209-17212.
- Goto S., Nagahiro S., Korematsu K., Ushio Y., Fukunaga K., Miyamoto E., Hofer W. (1993) Cellular colocalization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and calcineurin in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Neurosci. Lett.* **149**, 189-192.
- Greengard P., Valtorta F., Czernik A.J., Benfenati F. (1993) Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* **259**, 780-785.
- Grynspan F., Griffin W.R., Cataldo A., Katayama S., Nixon R.A. (1997) Active site-directed antibodies identify calpain II as an early-appearing and pervasive component of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **763**, 145-158.
- Hamakubo T., Kannagi R., Murachi T., Matus A. (1986) Distribution of calpains I and II in rat brain. *J. Neurosci.* **6**, 3103-3111.
- Hanson P.I., Schulman H. (1992) Inhibitory autophosphorylation of multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase analyzed by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 17216-17224.
- Hanson P.I., Schulman H. (1992a) Neuronal Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 559-601.
- Hanson S.K., Grotta J.C., Waxham M.N., Aronowski J., Ostrow P. (1994) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in focal ischemia with reperfusion in rats. *Stroke* **25**, 466-473.
- Hara H., Onodera H., Yoshidomi M., Matsuda Y., Kyuya K. (1990) Staurosporine, a novel protein kinase C inhibitor, prevents postischemic neuronal damage in the gerbil and rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **10**, 646-653.
- Hashimoto Y., Schworer C.M., Colbran R.J., Soderling T.R. (1987) Autophosphorylation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. Effects on total and Ca^{2+} independent activities and kinetic parameters. *J. Biol. Chem.* **262**, 8051-8055.

- Hatanaka M., Yoshimura N., Murakami T., Kannagi R., Murachi T. (1984) Evidence for membrane associated calpain I in human erythrocytes. Detection by an immunoelectrophoretic blotting method using mono specific antibody. *Biochemistry* **23**, 3272-3276.
- Hiestand D.M., Kindy M.S. (1992) Calcium/calmodulin dependent protein kinase II mRNA in the gerbil brain after cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* **144**, 75-78.
- Hirai S., Kawasaki H., Yaniv M., Suzuki K. (1991) Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos by calpain. *FEBS Lett.* **287**, 57-61.
- Hofmann J. (1997) The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J.* **11**, 649-669.
- Hong S-C., Goto Y., Lanzino G., Soleau S., Kassell N.F., Lee K.S. (1994) Neuroprotection with a calpain inhibitor in a model of focal cerebral ischemia. *Stroke* **25**, 663-669.
- Honkaniemi J., Massa S.M., Sharp F.R. (1996) Apoptosis associated genes are induced in gerbil hippocampus. *Rest. Neurol. Neurosci.* **9**, 227-230.
- Hosey M., Borsotto M., Lazdunski M. (1986) Phosphorylation and dephosphorylation of dihydropyridinesensitive voltage-dependent Ca^{2+} channel in skeletal muscle membranes by cAMP- and Ca^{2+} -dependent processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3733-3737.
- Hu B.R., Kamme F., Wieloch T. (1995) Alterations of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and its messenger RNA in the rat hippocampus following normo- and hypothermic ischemia. *Neuroscience* **68**, 1003-1016.
- Hu B.-R., Wieloch T. (1995) Persistent translocation of Ca^{++} /calmodulin-dependent protein kinase II to synaptic junctions in the vulnerable hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia. *J. Neurochem.* **64**, 277-284.
- Huang K.P., Huang F.L. (1986) Conversion of protein kinase C from a Ca^{2+} -dependent to an independent form of phorbol ester-binding protein by digestion with trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 320-326.
- Hudman A., Aronowski J., Waxham M.N. (1993) Autophosphorylation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II is capable of regulating its distribution through self association. *Sci. Neurosci. Abstr.* **19**, 699.
- Hug H., Sarre T.F. (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction. *Biochem. J.* **291**, 329-343.
- Imajoh S., Kawasaki H., Suzuki K. (1986) Limited autolysis of calcium-activated neutral protease (CANP): reduction of the Ca^{2+} -requirement is due to the NH_2 -terminal processing of the large subunit. *J. Biochem. (Tokyo)* **100**, 633-642.

- Inomata M., Hayashi M., Nakamura M., Imahori K., Kawashima S. (1983) Purification and characterization of a calcium-activated neutral proteases from rabbit skeletal muscle which requires calcium ions of μM concentration. *J. Biochem. (Tokyo)* **93**, 291-294.
- Inomata M., Hayashi M., Nakamura M., Saito Y., Kawashima S. (1989) Properties of erythrocyte membrane binding and autolytic activation of calcium-activated neutral protease. *J. Biol. Chem.* **264**, 18838-18843.
- Jones E.G., Huntley G.W., Benson D.L. (1994) Alpha calcium calmodulin-dependent kinase II selectively expressed in a subpopulation of excitatory neurons in monkey sensory-motor cortex: comparison with GAD-67 expression. *J. Neurosci.* **14**, 611-629.
- Jordan J., Galindo M.F., Miller R.J. (1997) Role of calpain- and interleukin- 1β converting enzyme-like proteases in the β -amyloid-induced death of rat hippocampal neurons in culture. *J. Neurochem.* **68**, 1612-1621.
- Kamakura K., Ishiura S., Imajoh S., Nagata N., Sugita H. (1992) Distribution of calcium-activated neutral protease inhibitor in the central nervous system of the rat. *J. Neurosci. Res.* **31**, 543-548.
- Kanaseki T., Ikeuchi Y., Sugiura H., Yamauchi T. (1991) Structural features of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II revealed by electron microscopy. *J. Cell Biol.* **115**, 1049-1060.
- Kapiloff M.S., Mathis J.M., Nelson C.A., Lin C.R., Rosenfeld M.G. (1991) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase mediates a pathway for transcriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3710-3714.
- Kaprell H.P., Goll D.E. (1989) Effect of Ca^{+} on binding of the calpains to calpastatin. *J. Biol. Chem.* **264**, 17888-17896.
- Kasai Y., Inomata M., Hayashi M., Imahori K., Kawashima S. (1986) Isolation and characterization of monoclonal antibodies against calcium-activated neutral protease with low calcium sensitivity. *J. Biochem.* **100**, 183-190.
- Katsura K., Rodriques-de-Turco E.B., Folbergrova J., Vazan N.G., Siesjö Bo.K. (1993) Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis, and phospholipase A_2 and C activation during ischemia. *J. Neurochem.* **61**, 1677-1684.
- Kawasaki H., Imajoh S., Kawashima S., Hayashi H., Suzuki K. (1986) The small subunits of calcium dependent proteases with different calcium sensitivities are identical. *J. Biochem.* **99**, 1525-1532.
- Kelly P.T. (1992) Calmodulin-dependent protein kinase II. Multifunctional roles in neuronal differentiation and synaptic plasticity. *Mol. Neurobiol.* **5**, 153-177.

- Kelly P.T., McGuinness T.I., Greengard P. (1984) Evidence that the major postsynaptic density protein is a component of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 945-949.
- Kemp B.E., Pearson R.B., House C., Robinson P.J., Means A.R. (1989) Regulation of protein kinases by pseudosubstrate prototypes. *Cell Signal* **1**, 303-311.
- Kennedy M.B., Bennett M.K., Erondy N.E. (1983) Biochemical and immunochemical evidence that the "major postsynaptic density protein" is α subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 7357-7361.
- Kiessling M., Stumm G., Xie Y., Herdegen T., Aguzzi A., Bravo R., Gass P. (1993) Differential transcription and translation of immediate early genes in the gerbil hippocampus after transient global ischemia. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* **13**, 914-924.
- Kihara S., Shiraishi T., Nakagawa S., Toda K., Tabuchi K. (1994) Visualization of DNA double strand breaks in the gerbil hippocampal CA1 following transient ischemia. *Neurosci. Lett.* **175**, 133-136.
- Kikkawa U., Kishimoto A., Nishizuka Y. (1989) The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 31-44.
- Kirino T. (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* **230**, 57-69.
- Kirino T., Sano K. (1984) Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol. (Berlin)* **62**, 201-208.
- Kishimoto A., Kajikawa N., Shiota M., Nishizuka Y. (1983) Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease. *J. Biol. Chem.* **258**, 1156-1164.
- Kishimoto A., Mikawa K., Hashimoto K., Yasuda I., Tanaka S., Tominaga M., Kuroda T., Nishizuka Y. (1989) Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). *J. Biol. Chem.* **264**, 4088-4092.
- Kitano T., Hashimoto T., Kikkawa U., Ase K., Saito N., Tanaka C., Ichimori Y., Tsukamoto K., Nishizuka Y. (1987) Monoclonal antibodies against rat brain protein kinase C and their application to immunocytochemistry in nervous tissues. *J. Neurosci.* **7**, 1520-1525.
- Kochhar A., Saitoh T., Zivin J. (1989) Reduced protein kinase C activity in ischemic spinal cord. *J. Neurochem.* **53**, 946-952.
- Kolb S.J., Hudman A., Waxham M.N. (1995) Ca^{2+} /calmodulin kinase II translocates in a hippocampal slice model of ischemia. *J. Neurochem.* **64**, 2147-2152.

- Kolch W., Heidecker G., Kochs G., Hummel R., Vahldt H., Mishak H., Finkenzeller G., Marme D., Rapp U.R. (1993) Protein kinase C activates Raf-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**, 249-252.
- Kosower N.S., Glaser T. (1990) The calpain-calpastatin system and membrane fusion. In: Mellgren R.L., Murachi T.(eds.) *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis*. Boca Raton, Fla: CRC Press.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685.
- Lazarewicz J.W. (1996) Calcium transients in brain ischemia: role in neuronal injury. *Acta Neurobiol. Exp.* **56**, 299-311.
- Leahy J.C., Luo Y., Kent C.S., Meiri K.F., Vallano M.L. (1993) Demonstration of presynaptic protein kinase C activation following long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci.* **52**, 563-574.
- Lee K., Frank S., Vanderklish P., Arai A., Lynch G. (1991) Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurones from ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 7233-7237.
- Lee S.B., Rhee S.G. (1995) Significance of PIP₂ hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**, 183-189.
- Li Z., Banik N.L. (1995) The localization of m calpain in myelin: Immunocytochemical evidence in different areas of rat brain and nerves. *Brain Res.* **697**, 112-121.
- Lisman J. (1989) A mechanism for the Hebb and the anti Hebb processes underlying learning and memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9574-9578.
- Lisman J. (1994) The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *TINS* **17**, 406-412.
- Liu X.-B., Jones E.G. (1996) Localization of alfa type II calcium calmodulin-dependent protein kinase at glutamatergic but not γ -aminobutyric acid (GABAergic), synapses in thalamus and cerebral cortex. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**, 7332-7336.
- Llinás R., Gruner J.-A., Sugimori M., McGuinness T., Greengard P. (1991) Regulation by synapsin I and calcium/calmodulin dependent protein kinase II of transmitter release at the squid giant synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **821**, 3035-3039.
- Llinás R., McGuinness T., Leonard C.S., Sugimori M., Greengard P. (1985) Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at squid giant synapse. *J. Physiol.* **436**, 257-282.
- Louis J.C., Magal E., Yavin E. (1988) Protein kinase C alterations in the fetal rat brain global ischemia. *J. Biol. Chem.* **263**, 282-285.

- Louis J.C., Magal E., Brixi A., Steinberg R., Yavin E., Vincendon G. (1991) Reduction of protein kinase C activity in the adult rat brain following transient forebrain ischemia. *Brain Res.* **541**, 171-174.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lucas M., Sánchez-Margalet V. (1995) Protein kinase C involvement in apoptosis. *Gen. Pharmac.* **26**, 881-887.
- Lynch G., Baudry M. (1984) The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science* **224**, 1057-1063.
- Lynch G., Baudry M. (1987) Brain spectrin, calpain, and long-term changes in synaptic efficacy. *Brain Res. Bull.* **18**, 809-815.
- MacManus J.P., Hill I.E., Huang Z.G., Rasquinha I., Xue D., Buchan A.M. (1994) DNA damage consistent with apoptosis in transient focal ischemic neocortex. *Neuroreport* **5**, 493-496.
- Madden K.P., Clark W.M., Kochhar A., Zivin J.A. (1991) Effect of protein kinase C modulation on outcome of experimental CNS ischemia. *Brain Res.* **547**, 193-198.
- Maki M., Hatanaka M., Takano E., Murachi T. (1990) Structure-function relationship of calpastatins. In: R.L. Mellgren i T. Murachi (eds.), *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp.37-54.
- Maki M., Takano E., Mori H., Kannagi R., Murachi T., Hatanaka M. (1987) repetitive region of calpastatin is a functional unit of the proteinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **143**, 300-308.
- Malenka R.C. (1994) Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* **78**, 535-538.
- Malenka R.C., Kauer J.A., Perkel D.J., Mauk M.D., Kelly P.T., Nicoll R.A., Waxham M.N. (1989) An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* **340**, 554-557.
- Malinow R., Madison D.V., Tsien R.W. (1988) Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature (London)* **335**, 820-824.
- Malinow R., Schulman H., Tsien R.W. (1989) Inhibition of post-synaptic PKC or CaM KII blocks induction but not expression of LTP. *Science* **245**, 862-866.
- Manev H., Costa E., Wróblewski J.T., Guidotti A. (1990) Abusive stimulation of excitatory amino acid receptors: a strategy to limit neurotoxicity. *FASEB J.* **4**, 2789-2797.

- Matesic D.F., Lin R.C.S. (1994) Microtubule-associated protein 2 as an early indicator of ischemia induced neurodegeneration in the gerbil forebrain. *J. Neurochem.* **63**, 1012-1020.
- Mayer M.L., Miller R.J. (1990) Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca^{2+} in mammalian neurons. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 254-260.
- Mayford M., Wang J., Kandel E.R., O'Dell T.J. (1995) CaM KII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTP and LTD. *Cell* **81**, 891-904.
- McGlade-McCulloh E., Yamamoto H., Tan S.-E., Brickey D.A., Soderling T.R. (1993) Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Nature* **362**, 640-642.
- McNeil R.B., Colbran R.J. (1995) Interaction of autophosphorylated Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase II with neuronal cytoskeletal proteins. Characterization of binding to a 190-kDa postsynaptic density protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 10043-10049.
- Mellgren R.L., Song K., Mericle M.T. (1993) m-Calpain requires DNA for activity on nuclear proteins at low calcium concentrations. *J. Biol. Chem.* **268**, 653-657.
- Mellgren R.L. (1987) Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? *FASEB. J.* **1**, 110-115.
- Melloni E., Pontremoli S. (1991) The calpain calpastatin system: structural and functional properties. *J. Nutr. Biochem.* **2**, 467-476.
- Meyer T., Hanson P.I., Stryer L., Schulman H. (1992) Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science* **256**, 1199-1201.
- Miller S.G., Kennedy M.B. (1986) Regulation of brain type II Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca^{2+} -triggered molecular switch. *Cell* **44**, 861-870.
- Mochly-Rosen D., Khener H., Lopez J., Smith B.L. (1991) Intracellular receptors for activated protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**, 14866-14868.
- Molinari M., Anagli J., Carafoli E. (1994) Ca^{2+} -activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80 kDa form. *J. Biol. Chem.* **269**, 27992-27995.
- Molinari M., Maki M., Carafoli E. (1995) Purification of μ -calpain by a novel affinity chromatography approach. New insights into the mechanism of the interaction of the protease with targets. *J. Biol. Chem.* **270**, 14576-14581.
- Molloy S.S., Kennedy M.B. (1991) Autophosphorylation of type II Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in cultures of postnatal rat hippocampal slices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4756-4760.

- Morioka M., Fukunaga Y., Yasugawa S., Nagahiro S., Ushio Y., Miyamoto E. (1992) Regional and temporal alteration in Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II and calcineurin in the hippocampus of the rat brain after transient forebrain ischemia. *J. Neurochem.* **58**, 1798-1809.
- Morioka M., Fukunaga K., Nagahiro S., Kurino M., Ushio Y., Miyamoto E. (1995) Glutamate-induced loss of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II activity in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **64**, 2132-2139.
- Murphy N.P., Corider J., Glowinski J., Prémont J. (1994) Is protein kinase C activity required for the N-methyl-D-aspartate-evoked rise in cytosolic Ca^{2+} in mouse striatal neurons? *Eur. J. Neurosci.* **6**, 854-860.
- Murray A.W., Fournier A., Hardy S.J. (1987) Proteolytic activation of protein kinase C: a physiological reaction? *Trends Biochem. Sci. (TIBS)* **12**, 53-54.
- Nagao S., Saïdo T.C., Akita Y., Tsuchiya T., Suzuki K., Kawashima S. (1994) Calpain-calpastatin interactions in epidermoid carcinoma KB cells. *J. Biochem.* **115**, 1178-1184.
- Nakanishi K., Brewer K.A., Exton J.K. (1993) Activation of the isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **268**, 13-16.
- Nath R., Raser K.J., McGinnis K., Nadimpolli R., Statford O., Wang K.K. (1996) Effects of ICE-like protease and calpain inhibitors on neuronal apoptosis. *NeuroReport* **8**, 249-255.
- Newton A.C., Koshland D.E., Jr (1989) High cooperativity, specificity and multiplicity in the protein kinase C. *Lipid Interaction* **264**, 14909-14915.
- Nichols R.A., Sihra T.S., Czernik A.J., Nairn A.C., Greengard P. (1990) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II increases glutamate and noradrenaline release from synaptosomes. *Nature* **343**, 647-651.
- Nilsson E., Ostwald K., Karlsson J.O. (1991) Changes in brain calpain activity as a result of in vitro ischemia and pH alterations. *Mol. Chem. Neuropathol.* **14**, 99-111.
- Nishizuka Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**, 661-665.
- Nishizuka Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**, 607-614.
- Nishizuka Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**, 484-496.
- Nitatori T., Sato N., Waguri S., Karasawa Y., Araki H., Shibani K., Kominami E., Uchiyama Y. (1995) Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J. Neurosci.* **15**, 1001-1011.

- Nixon R.A. (1986) Fodrin degradation by calcium-activated neutral proteinase (CANP) in retinal ganglion cell neurons and optic glia: preferential localization of CANP activities in neurons. *J. Neurosci.* **6**, 1264-1271.
- Nixon R.A. (1989) Calcium-activated neutral proteinases as regulators of cellular function. Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **568**, 198-208.
- Nixon R.A., Saito K.-I., Grynspan F., Griffin W.R., Katayama S., Honda T., Mohan P.S., Shea T.B., Beerman M. (1994) Calcium-activated neutral protease (calpain) system in aging and Alzheimer's disease. *Ann. NY Acad. Sci.* **747**, 77-91.
- Nowak T.S., Osborne O.C., Suga S. (1993) Stress-protein and proto-oncogene expression as indicators of neuronal pathophysiology after ischemia. *Prog. Brain Res.* **96**, 195-208.
- Oancea E., Teruel M.N., Quest A.F.G., Meyer T. (1998) Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J. Cell. Biol.* **140**, 485-498.
- Ohno M., Yamamoto T., Watanabe S (1994) Intrahippocampal administration of NO synthase inhibitor L-NAME prevents working memory deficits in rats exposed to transient cerebral ischemia. *Brain Res.* **634**, 173-177.
- Ohno S. Akita Y., Hata A., Osada S., Kubo K., Konno Y., Akimoto K., Mizuno K., Saido T.C., Kuraki T., Suzuki K. (1991) Structural and functional diversities of a family of signal transducing protein kinases, protein kinase C family; two distinct classes of PKC conventional cPKC and novel nPKC. In: G. Weber (ed.) *Advances in Enzyme Regulation*, vol. **31**, pp. 287-303, Pergamon Press Oxford.
- Ohtani K., Sakurai H., Oh E., Iwata E., Tsuchiya T., Tsuda M. (1995) Involvement of protein kinase C in Ca^{2+} signaling pathways to activation of AP-1 DNA-binding activity evoked via NMDA- and voltage-gated Ca^{2+} channels. *J. Neurochem.* **65**, 605-614.
- Onizuka K., Kunimatsu M., Ozaki Y., Muramatsu K., Sasaki M., Nishino H. (1995) Distribution of μ -calpain proenzyme in the brain and other neural tissues in the rat. *Br. Res.* **697**, 179-186.
- Onodera H., Hara H., Kogure K., Fukunaga K., Ohta Y., Niyamoto E. (1990) Ca^{2+} /calmodulin -dependent protein kinase II immunoreactivity in the rat hippocampus after forebrain ischemia. *Neurosci. Lett.* **113**, 134-138.
- Osada K., Mizuno K., Saido T.C., Akita Y., Suzuki K. Kuroki T., Ohno S. (1990) A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC η , a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J. Biol. Chem.* **265**, 22434-22440.

- Patel G., Stabel S. (1989) Expression of a functional protein kinase C- γ using a baculovirus vector purification and characterization of a single protein kinase C isoenzyme. *Cell Signalling* **1**, 227-240.
- Patton B.L., Miller S.G., Kennedy M.B. (1990) Activation of type II calcium/calmodulin – dependent protein kinase by Ca^{2+} calmodulin is inhibited by autophosphorylation of threonine within the calmodulin – binding domain. *J. Biol. Chem.* **265**, 11204-11212.
- Payne M.E., Fong Y.-L., Ono T., Colbran R.J., Kemp B.E., Soderling T.R., Means A.R. (1988) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: characterization of distinct calmodulin-binding and inhibitory domain. *J. Biol. Chem.* **263**, 7190-7195.
- Payne M.E., Schworer C.M., Soderling T.R. (1983) Purification and characterization of rabbit liver calmodulin-dependent glycogen synthase kinase. *J. Biol. Chem.* **258**, 2376-2382.
- Perlmutter L.S., Siman R., Gall C., Seubert P., Baudry M., Lynch G. (1988) The ultrastructural localization of calcium-activated protease “calpain” in rat brain. *Synapse* **2**, 79-88.
- Pettigrew L.C., Holtz M.L., Craddock S.D., Minger S.L., Hall N., Geddes J.W. (1996) Microtubular proteolysis in focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **16**, 1189-1202.
- Ponten U., Ratcheson R.A., Salford L.G., Siesjö B.K. (1973) Optimal freezing conditions for cerebral metabolites in rats. *J. Neurochem.* **21**, 1127-1138.
- Pontremoli S., Melloni E., Michetti M., Sacco O., Salamino F., Sparatore B., Horecker B.L. (1986) Biochemical responses in activated human neutrophils mediated by protein kinase C and Ca^{2+} -requiring proteinase. *J. Biol. Chem.* **261**, 8309-8313.
- Pontremoli S., Melloni E., Damiani G., Salamino F., Sparatore B., Michetti M., Horecker B.L. (1988) Effects of monoclonal anti-calpain antibody on responses of stimulated human neutrophils. Evidence for a role for proteolytically modified protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **263**, 1915-1919.
- Pontremoli S., Michetti M., Melloni E., Sparatore B., Salamino F., Horecker B. (1990) Identification of the proteolytic all activated forms of protein kinase C in stimulated human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3705-3708.
- Pulsinelli W.A. (1985) Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog. Brain Res.* **63**, 29-37.
- Pulsinelli W.A., Brierley J.B., Plurn F. (1982) Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.* **11**, 491-498.
- Pulsinelli W.A., Duffy T.E. (1983) Regional energy balance in rat brain after transient forebrain ischemia. *J. Neurochem.* **40**, 1500-1503.

- Quimet C.C., McGuinness T.L., Greengard P. (1984) Immunocytochemical localization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5604-5608.
- Rami A., Ferger D., Krieglstein J. (1997) Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neurosci. Res.* **27**, 93-97.
- Rami A., Krieglstein J. (1993) Protective effects of calpain inhibitors against neuronal damage caused by cytotoxic hypoxia in vitro and ischemia in vivo. *Brain Res.* **609**, 67-70.
- Rich D.P., Schworer C.M., Colbran R.J., Soderling T.R. (1990) Proteolytic activation of calcium/calmodulin dependent protein kinase II: putative function in synaptic plasticity. *Mol. Cell. Neurosci.* **1**, 107-116.
- Roberts-Levis J., Savage M., Marcy V., Pinsker L., Siman R. (1994) Immunolocalization of calpain I-mediated spectrin degradation to vulnerable neurons in the ischemic gerbil brain. *J. Neurosci.* **14**, 3934-3944.
- Roberts-Lewis J.M., Marcy V.R., Zhao Y., Vaught J.L., Siman R., Lewis M.E. (1993) Aurintricarboxylic acid protects hippocampal neurons from NMDA- and ischemia-induced toxicity in vivo. *J. Neurochem.* **61**, 378-381.
- Rodriguez-Sanchez P., Tejero-Diez P., Diez-Guerra F.J. (1997) Glutamate stimulates neurogranin phosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* **221**, 137-140.
- Rogers S., Wells R., Rechsteiner M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-368.
- Ron D., Chen C.-H., Caldwell J., Janieson L., Orr E., Mochly-Rosen D. (1994) Cloning of intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the subunit of G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 839-843.
- Rosen A., Keenan K.F., Thelen M., Nairn A.C., Aderem A.A. (1990) Activation of protein kinase C results in the displacement of its myristoylated, alanine-rich substrate from punctate structures in macrophage filopodia. *J. Exp. Med.* **172**, 1211-1215.
- Rostas J.A.P., Dunkley P.R. (1992) Multiple forms and distribution of calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II in brain. *J. Neurochem.* **59**, 1191-1202.
- Sahyoun N., Levine I., Bronson D., Cuatrecasas P. (1984) Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase in neuronal nuclei. *J. Biol. Chem.* **259**, 9341-9344.
- Sahyoun N., Levine III H., Cuatrecasas P. (1984a) Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases from the neuronal nuclear matrix and post-synaptic density are structurally related. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4311-4315.

- Saido T, Yokota M., Nagao S., Yamura I., Tani E., Tsuchiya T., Suzuki K., Kawashima S (1993) Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain. *J. Biol. Chem.* **268**, 25239-25243.
- Saido T.C., Nagao S., Shiramine M., Tsukaguchi M., Sorimachi H., Murofushi H., Tsuchiya T., Ito H., Suzuki K. (1992) Autolytic transition of μ -calpain upon activation as resolved by antibodies distinguishing between pre- and post-autolysis forms. *J. Biochem. (Tokyo)* **111**, 81-86.
- Saido T.C., Sorimachi H., Suzuki K. (1994) Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement *FASEB J.* **8**, 814-822.
- Saito K.-I., Elce J.S., Hamos J.E., Nixon R.A. (1993) Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer's disease: A potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2628-2632.
- Saitoh T., Masliah E. (1993) In: *Alzheimer's Disease: Advances in Clinical and Basic Research*, eds. Corain B., Iqbal K., Nicolinin M., Winblad B., Wiśniewski H., Zatta P. (eds), Wiley, New York, pp. 349-353
- Salamino F., De Tullio R., Mengotti R., Viotti P.L., Melloni E., Pontremoli S. (1993) Site-directed activation of calpain is promoted by a membrane associated natural activator protein. *Biochem. J.* **290**, 191-197.
- Salamino F., Averna M., Tedesco I., De Tullio R., Melloni E., Pontremoli S. (1997) Modulation of rat brain calpastatin efficiency by post-translational modifications. *FEBS Let.* **412**, 433-438.
- Sarin A., Adams D.H., Henkart P.A. (1993) Protease inhibitors selectively block T cell receptor-triggered programmed cell death in a murine T cell hybridoma and activated peripheral T cells. *J. Exp. Med.* **178**, 1693-1700.
- Schoepp D.D., Sacca A.J. (1994) Metabotropic glutamate receptors and neuronal degenerative disorders. *Neurobiol. Aging* **15**, 261-263.
- Schulman H., Greengard P. (1978) Ca^{2+} -dependent phosphorylation system in membranes from various tissues and its activation by calcium-dependent regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5432-5436.
- Schulman H., Heist K., Srinivasan M. (1995) Decoding Ca^{2+} signals to the nucleus by multifunctional CaM kinase. In: *Gene expression in the central nervous system* (Eds. A.C.H. Yu, L.F. Eng, U.J. McMahan, H. Schulman, E.M. Shooter and A. Stadlin), Elsevier, Amsterdam, p. 95-104.
- Seubert P., Lee K., Lynch G. (1989) Ischemia triggers NMDA receptor-linked cytoskeletal proteolysis in hippocampus. *Brain Res.* **492**, 366-370.

- Seubert P., Lynch G. (1990) Plasticity to pathology: brain calpains as modifiers of synaptic structure. In: Intracellular calcium-dependent proteolysis. Mellgren R.L., Murachi T. (eds.) pp. 251-263, Boca Raton, FL: CRC.
- Shackelford D.A., Yeh R.Y., Hsu M., Buzsaki G., Zivin J.A. (1995) Effect of cerebral ischemia on calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity and phosphorylation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **15**, 450-461.
- Shea T.B., Beermann M.L., Griffin W.R., Leli U. (1994) Degradation of protein kinase C α and its free catalytic subunit, protein kinase M, in intact human neuroblastoma cells and under cell-free conditions: evidence that PKM is degraded by calpain - mediated proteolysis at a faster rate than PKC. *FEBS Lett.* **350**, 223-229.
- Shea T.B., Cressman C.M., Spencer M.J., Beermann M.L., Nixon R.A. (1995) Enhancement of neurite outgrowth following calpain inhibition is mediated by protein kinase C. *J. Neurochem.* **65**, 517-527.
- Shea T.B., Spencer M.J., Beermann M.L., Cressman C.M., Nixon R.A. (1996) Calcium influx into human neuroblastoma cells induces ALZ-50 immunoreactivity: involvement of calpain-mediated hydrolysis of protein kinase C. *J. Neurochem.* **66**, 1539-1549.
- Sheng M., Thompson M.A., Greenberg M.E. (1991) CREB a Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* **252**, 1427-1430.
- Siciliano J.C., Toutant M., Derkinderen P., Sasaki T. (1996) Differential regulation of proline-rich Tyrosine kinase 2/cell adhesion kinase β (PYK2/CAK β) and pp125^{FAK} by glutamate and depolarization in rat hippocampus. *J. Biol. Chem.* **271**, 28942-28946.
- Siesjö B.K. (1978) In: Brain Energy Metabolism, Siesjö B.K. (ed.), p. 454, . Wiley and Sons, Chichester, New York, Toronto.
- Siesjö B.K. (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. *J. Neurosurg.* **77**, 169-184; 337-354.
- Siesjö B.K., Bengtsson F. (1989) Calcium fluxes, calcium antagonists and calcium related pathology in brain ischemia, hypoglycemia and spreading depression. A unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood. Flow Metab.* **9**, 127-140.
- Siesjö B.K., Katsura K., Møllergaard P., Ekholm A., Lundgren J., Smith M.L. (1993) Acidosis-related brain damage. In: Progress in Brain Research. Kogure K., Hossmann K.A. Siesjö B.K. (eds.), **96**, pp. 23-48. Elsevier, Amsterdam.
- Silva A.J., Paylor R., Wehner J.M., Tonegawa S. (1992a) Impaired spatial learning in α -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* **257**, 206-211.

- Silva A.J., Stevens C.F., Tonegawa S., Wang Y. (1992) Deficient hippocampal long-term potentiation in α -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* **257**, 201--206.
- Siman R., Baudry M., Lynch G. (1987) Calcium-activated proteases as possible mediators of synaptic plasticity. In *Synaptic Function*, G.M. Edelman, W.E. Gall, W.M. Cowan (eds). New York: John Wiley and Sons, Inc., pp. 519-548.
- Siman R., Baudry H., Lynch G. (1984) Brain fodrin: substrate for calpain I, an endogenous calcium-activated protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3572-3576.
- Smith M.K., Colbran R.J., Brickly D.A., Soderling T.R. (1992) Functional determinants in the autoinhibitory domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Role of His 282 and multiple basic residues. *J. Biol. Chem.* **267**, 1761-1768.
- Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K. (1997) Structure and physiological functions of calpains. *Biochem. J.* **328**, 721-732.
- Squier M.K.T., Cohen J.J. (1997) Calpain, an upstream regulator of thymocyte apoptosis. *J. Immunol.* **158**, 3690-3697.
- Srinivasan Y., Elmer L., Davis J., Bennett V., Angelides K. (1988) Ankyrin and spectrin associate with voltage-dependent sodium channels in brain. *Nature* **333**, 177-180.
- Staton P.C., Bristow D.R. (1997) The dietary excitotoxins β -N-methylamino-L-alanine and β -N-oxalylamino-L-alanine induce necrotic- and apoptotic-like death of rat cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **69**, 1508-1518.
- Steiner B, Mandelkow E.-M., Biernat J., Gustke N., Meyer G.E., Schmidt B., Mieskes G., Soling G.D., Drechsel D., Kisschner M.W., Goedert M., Mandelkow E. (1990) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca^{2+} -calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *EMBO J.* **9**, 3539-3544.
- Suzuki K., Imajoh S., Emori Y, Kawasaki H., Minami Y. (1988) Regulation of activity of calcium activated neutral protease. In: *Adv. Enzyme Reg.* G.Weber (ed.), **27**, pp. 155-169. Pergamon Press. London.
- Suzuki R., Yamaguchi T., Kirino T., Orzi S., Klatzo I. (1983) The effect of 5 minute ischemia in mongolian gerbils: Blood-brain barrier, cerebral blood flow and local glucose utilization changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **60**, 207-216.
- Suzuki T., Imajoh S., Emori Y., Kawasaki H., Minami Y., Ohno S. (1987) Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor: activation at the cell membrane and biological function. *FEBS Lett.* **220**, 271-277.
- Suzuki T., Okumura-Noji K., Ogura A., Tanaka R., Nakamura K., Kudo Y. (1992) Calpain may produce a Ca^{2+} -independent form of kinase C in long-term potentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 1515-1520.

- Suzuki T., Okumura-Noji K., Tanaka R., Tada T. (1993) Translocation of cytosolic α -subunit of Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase II (CaMK II) to particulate fractions and postsynaptic density (PSD) after decapitation. *Neuroscience* **19**, 273 (Abstr.).
- Taft W.C., Tennes-Rees K.A., Blair R.E., Clifton G.L., DeLorenzo R.J. (1988) Cerebral ischemia decreases endogenous calcium-dependent protein phosphorylation in gerbil Brain. *Brain Res.* **447**, 159-163.
- Tan S.E., Wenthold R.J., Soderling T.R. (1994) Phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **14**, 1123-1129.
- Thiel G., Czernik A.J., Gorelick F., Nairn A.C., Greengard P. (1988) Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II: identification of threonine-286 as the autophosphorylation site in the α subunit associated with the generation of Ca^{2+} independent activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6337-6341.
- Thomas K.L., Laroche S., Errington M.L., Bliss T.V.P., Hunt S.P. (1994) Spatial and temporal changes in signal transduction pathways during LTP. *Neuron* **13**, 737-745.
- Tobimatsu T., Fujisawa H. (1989) Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J. Biol. Chem.* **264**, 17907-19912.
- Tomba P., Baki A., Schád E. (1996) The calpain cascade μ -calpain activates m-calpain. *J. Biol. Chem.* **271**, 33161-33164.
- Towbin H., Staehlin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Tsuda M. (1996) Cascade of gene expression induced by Ca^{2+} signals in neurones. *Neurochem. Int.* **29**, 443-451.
- Tzigaret C., McIntosh T.K., Okiyama K., Jenkins W.L., Prasad M.R. (1993). Measurement of hippocampal levels of cellular second messengers following *in situ* freezing. *J. Neurochem.* **60**, 827-834.
- Vallano M.L., Goldenring J.R., Lasher R.S., DeLorenzo R.J. (1986) Association calcium/calmodulin-dependent kinase with cytoskeletal preparations: phosphorylation of tubulin, neurofilament, and microtubule-associated proteins. *Ann. NY Acad. Sci.* **466**, 357-374.
- Valtorta F., Benfenati F., Greengard P. (1992) Structure and function of the synapsis. *J. Biol. Chem.* **267**, 7195-7198.
- Van Lookeren Campagne M., Lucassen P.J., Vermeulen J.P., Balázs R. (1995) NMDA and kainate induce internucleosomal DNA cleavage associated with both apoptotic and necrotic cell death in the neonatal rat brain. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 1627-1640.

- Wang K.K., Villalobo A., Roufogalis B.D. (1989) Calmodulin-binding protein as calpain substrates. *Biochem. J.* **262**, 693-706.
- Wang K.K.W., Yuen P.W. (1994) Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potential. *Trend. Pharmacol. Sci.* **15**, 412-419.
- Waxham M.N., Grotta J.C., Silva A.J., Strong R., Aronowski J. (1996) Ischemia-induced neuronal damage: a role for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **16**, 1-6.
- Wieloch T., Cardell M., Bingren H., Zivin J., Saitoh T. (1991) Changes in the activity of protein kinase C and the differential subcellular redistribution of its isozymes in the rat striatum during and following transient forebrain ischemia. *J. Neurochem.* **56**, 1227-1235.
- Wolfe F.H., Sathe S.K., Goll D.E., Kleese W.C., Edmunds T., Duperret S.M. (1989) Chicken skeletal muscle has three Ca^{2+} -dependent proteinases. *Biochim. Biophys. Acta* **998**, 236-250.
- Wu K., Huang Y., Adler J., Black I.B. (1992) On the identity of the major post-synaptic density protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3015-3019.
- Yamamoto H., Fukunaga K., Lee K., Soderling T.R. (1992) Ischemia-induced loss of brain calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurochem.* **58**, 1110-1117.
- Yamamoto H., Fukunaga K., Tanaka E., Miyamoto E. (1983) Ca^{2+} -and calmodulin-dependent phosphorylation of microtubule-associated protein 2 and tau factor, and inhibition of microtubule assembly. *J. Neurochem.* **41**, 1119-1125.
- Yamashima T., Saido T.C., Takita M., Miyazawa A., Yamano J., Miyakawa A., Nishijo H., Yamashita J., Kawashima S., Ono T., Yoshioka T. (1996) Transient brain ischaemia provokes Ca^{2+} , PIP_2 and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys. *Europ. J. Neurosci.* **8**, 1932-1944.
- Yamauchi T., Nakata H., Fujisawa H. (1981) A new activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **256**, 5404-5409.
- Yanagihara N., Tachikawa E., Izumi F., Yasugawa S., Yamamoto H., Myamot E. (1991) Staurosporine: an effective inhibitor for Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurochem.* **56**, 294-298.
- Yano S., Fukunaga K., Ushio Y., Miyamoto E. (1994) Activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and phosphorylation of intermediate filament proteins by stimulation of glutamate receptors in cultured rat cortical astrocytes. *J. Biol. Chem.* **269**, 5428-5439.
- Yavin E., Inserte-Iqual J., Gil S. (1995) Ischemia-triggered translocation and inactivation of protein kinase C isoforms in the fetal brain. *J. Neurochem.* **65**, 2594-2602.

- Yokota M., Saido T.C., Tani E., Kawashima S., Suzuki K. (1995) Three distinct phases of fodrin proteolysis induced in postischemic hippocampus. Involvement of calpain and unidentified protease. *Stroke* **26**, 1901-1907.
- Yoshizawa T., Sorimachi H., Tomioka S., Ischiura S., Suzuki K. (1995) Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 376-383.
- Young III W.S. (1991) In situ hybridization and northern analyses of the expression of protein kinase C genes using oligodeoxyribonucleotide probes. *Focus* **13**, 46-49.
- Zabłocka B. (1997) Udział kinazy białkowej C w indukcji zmian poniedokrwiennych w hipokampie. Praca doktorska.
- Zabłocka B., Domańska-Janik K. (1993) Involvement of protein kinase C in various cellular systems transducing ischemia evoked signal. *Acta Neurobiol. Exp.* **53**, 25-29.
- Zabłocka B., Domańska-Janik K. (1994) PAF antagonist, BN52021, inhibits [3 H]D-aspartate release after ischaemia in vitro. *NeuroReport* **6**, 85-88.
- Zabłocka B., Domańska-Janik K. (1996) Enhancement of D-[3 H]aspartate release during ischemia like conditions in rat hippocampal slices: source of excitatory amino acids. *Acta Neurobiol. Exp.* **56**, 63-70.
- Zabłocka B., Łukasiuk K., Łazarewicz J.W., Domańska-Janik K. (1994a) Modulation of ischemic signal by antagonists of N-methyl-D-aspartate, nitric oxide syntase and platelet-activating factor in gerbil hippocampus. *J. Neurosci. Res.* **40**, 233-240.
- Zabłocka B., Maternicka K., Zalewska T., Domańska-Janik K. (1998) Expression of Ca^{2+} -dependent (classical) PKC mRNA isoforms after transient cerebral ischemia in gerbil hippocampus. *Brain Res.* **779**, 254-258.
- Zalewska T., Domańska-Janik K. (1990) Functional role of calcium activated neutral proteinase (CANP) in the central nervous system. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego. Prace z Biologii Molekularnej CML XXXVI*, 105-115.
- Zalewska T., Kasai Y., Kawashima S. (1989) Calcium-dependent proteolytic activity in hypoxic rat brain. *Biomed. Biochim. Acta* **48**, 166-169.
- Zalewska T., Strosznajder J., Kawashima S. (1988) Modulation of calcium-dependent neutral protease activity by fatty acids and lysophospholipids. *Neurochem. Pathol.* **8**, 79-89.
- Zola-Morgan S., Squire L.R., Amaral D.G. (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci.* **6**, 2950-2967.