

TRANSLOKACJA BIAŁEK SYGNAŁOWYCH JAKO CZĘŚĆ SKŁADOWA ZJAWISKA OPÓŹNIONEJ, PONIEDOKRWIENNEJ ŚMIERCI NEURONÓW

TRANSLOCATION OF SIGNALING PROTEINS IS AN ELEMENT
OF THE DELAYED POSTISCHEMIC NEURONAL CELL DEATH

Barbara ZABŁOCKA

Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego PAN

Streszczenie: Od wielu lat prowadzone są intensywne badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów śmierci neuronów w wyniku krótkotrwałego przerwania dopływu krwi do mózgu. Obecnie wydaje się, że istotnym elementem przekazywania sygnału ischemicznego jest przemieszczanie się pomiędzy przedziałami komórkowymi wielu białek, które w zależności od lokalizacji i współpartnerów mogą pełnić różne funkcje. Przejściowe niedokrwienie mózgu powoduje bardzo szybką translokację wielu kinaz białkowych (PKC, CamKII) do zagęszczeń postsynaptycznych, gdzie wydają się oddziaływać na rozprzestrzenianie się sygnału ischemicznego. W dłuższym czasie po niedokrwieniu we frakcji mitochondriów zwiększa się ilość kinazy JNK i proapoptycznego białka Bad, a zmniejsza się ilość kinazy Raf-1. Również lokalizacja cytochromu c ulega dynamicznym zmianom w wyniku ischemii. Obok swojego tradycyjnego miejsca w mitochondriach, występuje on w poischemicznej cytoplazmie, gdzie może aktywować kompleks apoptosomu i kaskadę kaspaz. Coraz liczniejsze dane wskazują, że przejściowa ischemia mózgu inicjuje w niedokrwionych komórkach szybkie zmiany w wewnątrzkomórkowej lokalizacji, a tym samym funkcji wielu białek sygnałowych.

Słowa kluczowe: niedokrwienie mózgu, zagęszczenie postsynaptyczne, mitochondria, szlaki przekazywania sygnału, uszkodzenie mózgu, kinazy białkowe.

Summary: Neuronal degeneration following transient global cerebral ischaemia develops from complex series of pathophysiological events that evolve in time and intracellular space. During both, the early and delayed, postischemic stages translocation of proteins to postsynaptic density (PSD) and mitochondria are probably associated with recovery or cell death in vulnerable brain regions. Early after the insult a significant increase in the amount of CamKII and PKC isoforms is observed in PSD. Sustained changes in protein kinases content in PSD may cause persistent alteration in synaptic transmission. In the time course of reperfusion the activation state of key signaling molecules changes. Western blot analysis of phosphorylated forms of protein kinases revealed persistent activation of JNK, being limited mostly to vulnerable CA1 region. On the contrary, activation of ERK, although observed transiently

in both parts, was enhanced for a longer time in the abdominal, resistant part of hippocampus. Moreover, the amount of active JNK linked with mitochondria was significantly increased and preceded neuronal death in CA1. In parallel, the amount of pro-survival Raf-1 kinase decreased in mitochondria and proapoptotic Bad protein content was increased. Concomitantly, transient ischemia evokes biphasic cytochrome c release from mitochondria. Cytochrome c in cytoplasm may be involved in the activation of apoptosome, therefore cascade of caspases. Chasing a protein translocation in brain ischemia pathology this is a new research approach which might contribute to understand of the whole process and to search for a new points to prevent neuronal death.

Key words: brain ischemia, postsynaptic density, mitochondria, signal transduction pathways, neuronal degeneration, protein kinases.

WSTĘP

Niedokrwienie mózgu występuje u jednej na 250 osób i jest trzecią w krajach rozwiniętych, a czwartą w Polsce przyczyną zgonów. Szansa wystąpienia udaru niedokrwiennego rośnie wraz z wiekiem i u osób po 65 roku życia dotyka około 5% populacji w tej grupy wiekowej. Już kilkuminutowe przerwanie krążenia krwi powoduje uszkodzenia mózgu wymagające rehabilitacji zmierzającej do przywrócenia choć części utraconych funkcji. Warunkiem znalezienia skutecznych metod zapobiegania występowaniu i rozwijaniu się poniedokrwiennej śmierci neuronów jest badanie mechanizmów tego procesu.

Całkowite i uogólnione niedokrwienie mózgu wywołuje nagłe załamanie homeostazy tkanki oraz charakterystyczny zespół ciężkich zaburzeń neurologicznych. W zależności od czasu trwania niedokrwienia, jak i towarzyszących mu zaburzeń systemowych ostre zmiany metaboliczne mogą cofnąć się całkowicie lub spowodować szybką śmierć organizmu. Pomiędzy tymi skrajnymi reakcjami na niedokrwienie znajduje się całe spektrum trwałych uszkodzeń strukturalno-funkcjonalnych, znanych pod nazwą zespołu encefalopatii poniedokrwiennej. Bezpośrednie skutki ostrego niedoboru tlenu i glukozy, występujące w czasie zatrzymania krążenia mózgowego, prowadzą w ciągu kilkunastu minut do ustania funkcji mózgu, nieodwracalnych zmian strukturalnych i śmierci organizmu. Wydaje się, że mechanizm powstawania opóźnionych uszkodzeń poniedokrwienych, rozwijających się selektywnie tylko w niektórych, wyjątkowo wrażliwych strukturach mózgu, takich jak hipokamp, jest wysoce specyficzny i znacznie odbiegający od tego, co obserwuje się w ostrej fazie patologii niedokrwiennej. Uszkodzenia te powstają prawdopodobnie w wyniku rozwoju określonej sekwencji wtórnych zaburzeń biochemicznych i molekularnych indukowanych stresem niedokrwienym. Nasze ostatnie badania, jak i liczne doniesienia z piśmiennictwa wskazują, że szczególnie istotne w przekazywaniu sygnału prowadzącego do opóźnionej śmierci neuronów w ischemii mózgu są dynamicznie zmieniające się kompleksy białkowe w zagęszczeniach postsynaptycznych (PSD) i w mitochondriach. Translokacje białek sygnałowych do wyżej wspomnianych struktur prowadzą do i) rozprzestrzeniania bodźca w komórce, co może skutkować jej przeżyciem lub eliminacją oraz ii) do końcowych etapów śmierci neuronów we wrażliwych na krótkie niedokrwienie rejonach mózgu, którym towarzyszy wtórne załamanie energetyczne [49] oraz aktywacja szlaków sygnałowych charakterystycznych dla programu apoptozy [6].

Mechanizm(y) i związki pomiędzy zdarzeniami, indukującymi bądź towarzyszącymi poischemicznej, opóźnionej śmierci neuronów, nie są w pełni poznane i stanowią bezpośredni cel wielu badań podejmowanych w laboratoriach na całym świecie. Nadrzędnym celem prowadzonych prac jest stworzenie uporządkowanego opisu przekazywania sygnału w niedokrwionych komórkach, który może pomóc w znalezieniu nowych strategii leczniczych przeciwdziałających uszkodzeniom neuronów w ischemii mózgu.

MODELE BADAWCZE

Przerwanie dopływu krwi do mózgu powoduje poważne zaburzenia metaboliczne, obserwowane w trakcie niedokrwienia i po przywróceniu krążenia. W modelu przejściowego, 5-minutowego niedokrwienia mózgu gerbilla mongolskiego (*Meriones unguiculatus*) morfologiczne oznaki ubytku neuronów obserwowane są w sektorze CA1 hipokampów po 2–3 dniach reperfuzy [21,30]. Podobny skutek czasowego niedokrwienia mózgu obserwuje się również w innych modelach ischemii u szczura [32,41,51]. Zanik neuronów we wrażliwych rejonach mózgu ma wiele cech charakterystycznych dla programowanej śmierci komórek – apoptozy [14]. W modelach ischemii zarówno u szczura, jak i u gerbilla po upływie 7 dni od niedokrwienia większość (ponad 80%) neuronów wrażliwej okolicy CA1 hipokampa ginie, a złożony, wieloczynnikowy proces prowadzący do śmierci opisywany jest jako opóźniona, selektywna, poniedokrwienna śmierć neuronów [9,54].

SYGNAŁ ISCHEMICZNY

Już w trakcie pierwszych minut trwania ischemii obserwowane jest gwałtowne zahamowanie aktywności elektrycznej mózgu [55] i postępujące wyczerpywanie się związków wysokoenergetycznych [16,34]. Dochodzi do spadku potencjału błonowego mitochondriów oraz uwalniania białek proapoptotycznych. Zaburzona zostaje homeostaza jonowa zarówno w komórkach nerwowych, jak i glejowych. Jednocześnie obserwowany jest nadmierny w stosunku do fizjologicznego wyrzut do przestrzeni międzykomórkowych pobudzających aminokwasów, głównie kwasu glutaminowego [39]. Kwas glutaminowy uwalniany jest z pęcherzyków synaptycznych, z zakończeń nerwowych oraz z tzw. puli metabolicznej aminokwasów. Komórki glejowe, na skutek wyczerpania się związków wysokoenergetycznych i odwrócenia działania transporterów aminokwasów [2,43], stają się dodatkowym źródłem m.in. pobudzających neurotransmiterów i zwiększają tym samym pobudzenie komórek nerwowych. Aktywacja receptorów kwasu glutaminowego i związany z tym znaczny wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie neuronów powodują aktywację wielu enzymów regulowanych jonami wapnia [59], co w konsekwencji prowadzi do uruchomienia szlaków sygnałowych prowadzących do przezwyciężenia patologicznego bodźca lub do eliminacji komórek w rejonach szczególnie wrażliwych. Jeśli niedokrwienie trwa stosunkowo krótko (do około 15 min), to po przywróceniu krążenia następuje odbudowa ATP, jednak niewydolny

łańcuch oddechowy jest źródłem wolnych rodników, które utleniają białka, lipidy i kwasy nukleinowe przyczyniając się do wtórnego uszkodzenia komórek.

PSD I BIAŁKA PRZEKAZUJĄCE SYGNAŁ WAPNIOWY

Receptory neurotransmiterów umieszczone w błonie postsynaptycznej skupiają wokół siebie szereg białek przekazujących sygnały do wnętrza komórki. Podbłonowa, elektronogęsta struktura wielobiałkowa nosi nazwę „zagęszczenie postsynaptyczne” (PSD) [28]. Znajdujemy tu białka receptorowe dla kwasu glutaminowego (typu NMDA i mGluR), szkieletowe z rodzin MAGUK, GKAP, Shank i Homer, kinazy białkowe, neurofilamenty, mikrotubule, aktyny i wiele innych [42]. Dotychczasowe badania PSD po niedokrwieniu mózgu wykazały znaczny przyrost ilości białka związanego z tą strukturą, który odzwierciedlał przyrost objętości PSD obserwowany w mikroskopie elektronowym [18,23,35,58]. Mając na uwadze złożone oddziaływania składników PSD wydaje się, że przebudowa zagęszczeń postsynaptycznych jest jednym z pierwszych etapów szlaków wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału. Kaskada zdarzeń zapoczątkowanych niedokrwieniem rozprzestrzenia się od miejsc kontaktu synaptycznego na wszystkie przedziały komórkowe i oddziałuje na funkcję struktur wewnątrzkomórkowych (mitochondriów, siateczki śródplazmatycznej, jądra komórkowego, cytoszkieletu), jak również obejmuje białka macierzy zewnątrzkomórkowej.

W badaniach prowadzonych na modelu krótkotrwałego niedokrwienia mózgu gerbila oraz w przedłużonej do 15 minut ischemii mózgu szczura zaobserwowano wzrost ilości białek związanych z PSD zarówno w obrazach ultrastrukturalnych, jak i posługując się metodą *western blot* z zastosowaniem przeciwciał rozpoznających aktywne formy kinaz białkowych [18,58]. Jednym z białek charakterystycznych dla PSD jest kinaza białkowa II, której aktywność zależy od jonów Ca^{2+} i kalmoduliny (CamKII). CamKII jest translokowana do PSD już w pierwszych sekundach ischemii mózgu. Jednocześnie aktywność tej kinazy mierzona wobec egzogenego, jak i endogenego substratu jest większa niż w mózgu kontrolnym, jednak wzrost aktywności jest mniejszy, niż można by wnioskować na podstawie przyrostu ilości białka. Nasze badania [18], jak i doniesienia innych [1,24] sugerują, że masowy przyrost ilości CamKII w czasie niedokrwienia kompensuje hamowanie aktywności fosforylacyjnej, które występuje w czasie załamania energetycznego w niedokrwionych neuronach. Ponadto obniża się aktywność CamKII w innych frakcjach błonowych. Wyniki te wskazują na istotną rolę CamKII w reakcji ischemicznej zagęszczeń postsynaptycznych. Równie istotny wydaje się udział kinaz białkowych C (PKC).

PKC obejmuje rodzinę 11 serynowo-treoninowych kinaz białkowych, których aktywność zależy od fosfolipidów i w zależności od podgrupy od Ca^{2+} i diacyloglicerolu [37,38]. PKC pełni kluczową rolę w niemal wszystkich procesach komórkowych włączając w to podziały, różnicowanie czy homeostazę jonową. Izofromom PKC przypisuje się też regulacyjną rolę w procesie apoptozy i regeneracji [36]. Z prac wielu badaczy oraz naszych obserwacji na modelu niedokrwienia mózgu gerbila wiemy o szybkiej aktywacji izofrom PKC regulowanych jonami wapnia Ca^{2+} i diacyloglicerolem (cPKC), jak również

izoform, których aktywność nie zależy od jonów Ca^{2+} (nPKC) [8,17,46]. PKC obecnej w PSD przypisuje się rolę jednego z regulatorów aktywności receptora NMDA [26] oraz wpływ na aktywność szlaku MAPK poprzez oddziaływanie z kinazą Raf-1 [52].

Kinazy białkowe należące do rodziny PKC reagują na stres ischemiczny szybką zmianą aktywności obserwowaną już w pierwszym okresie po przywróceniu krążenia [17]. W PSD po niedokrwieniu następuje 4–18-krotny przyrost ilości białka różnych izoform PKC w porównaniu z ich ilością u zwierząt kontrolnych [58]. Pośród cPKC obserwujemy 10-krotny przyrost powszechnie występujących izoform α i β , podczas gdy poziom izoformy γ , specyficznej dla neuronów podwyższa się dwukrotnie. Prawdopodobnie jest to spowodowane najwyższym kontrolnym poziomem tej izoformy w PSD. Ponadto, nasze badania po raz pierwszy pokazały spowodowane ischemią przemieszczenie do PSD izoform δ i ϵ , których kontrolny poziom w tej strukturze jest niemal niewykrywalny. Badania na izolowanej, oczyszczonej frakcji PSD zostały potwierdzone badaniami immunohistochemicznymi w mikroskopie elektronowym, które pokazują utrzymujący się co najmniej do 24 godzin po przywróceniu krążenia znaczny przyrost wielkości zagęszczeń postsynaptycznych i ilości cPKC, głównie w części CA1 hipokampów.

W badaniach wykorzystujących izolowaną frakcję PSD pochodzącą z mózgow zwierząt poddanych ischemii lub ze skrawków hipokampa w warunkach symulujących tę patologię wykazano, że poza wspomnianymi kinazami białkowymi enzymy proteolityczne – kalpainy są elementem struktury PSD [18]. Dwie izoformy kalpainy: μ i m mają różne wymagania dotyczące stężenia jonów Ca^{2+} koniecznych do ich aktywacji. Stwierdzono, że ischemia obniża ilość białka μ -kalpainy w PSD, podczas gdy poziom m -kalpainy nie zmienia się. Jednocześnie obserwowano obniżenie ilości fodryny, która jest białkiem cytoszkieletowym obecnym w PSD i substratem kalpain. Wydaje się, że obniżenie ilości enzymu proteolitycznego aktywowanego już w mikromolarnym stężeniu Ca^{2+} ma znaczenie ochronne i zabezpiecza komórki przed rozległą degradacją cytoszkieletu.

W wielobiałkowym kompleksie PSD kinazy białkowe CamKII i PKC wydają się mieć wiele funkcji. Po przebytych epizodzie niedokrwicznym mogą one aktywować różnorodne ścieżki sygnałowe, często o przeciwstawnej funkcji, między innymi mogą modulować aktywność kinazy białkowej Raf-1. Jej ilość w strukturze PSD także rośnie po niedokrwieniu, co w konsekwencji może zmieniać aktywność szlaków kinaz białkowych, w tym MAPK. Jednocześnie pewna pula kinazy Raf-1 może być związana z mitochondriami, gdzie ma swoje specyficzne substraty różne od tych, które może fosforylować, gdy występuje przy błonie plazmatycznej [7,53].

ISCHEMIA I SZLAKI KINAZ MAP I JNK

Jednym z lepiej poznanych wieloetapowych szlaków kontrolujących ekspresję genów jest szlak MAPK. W zależności od bodźca pobudzającego lub modyfikacji białek towarzyszących w tworzeniu sieci sygnalizacyjnej, kinazy te wykazują plejotropowe działania. Obecnie rodzina kinaz MAP dzielona jest na trzy grupy, w zależności od końcowej kinazy szlaku: ERK1,2; p38/SAPK oraz JNK/SAPK [27].

Szlak prowadzący do aktywacji ERK1,2 zaangażowany jest głównie w procesy podziału, wzrostu i funkcjonowania komórek w odpowiedzi na czynniki wzrostowe, ale także na niespecyficzne bodźce stresowe [22]. Wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia Ca^{2+} i depolaryzacja są także czynnikami aktywującymi kinazy ERK1 i 2 prawdopodobnie w wyniku stymulacji białek syn-GAP i Ras [44]. Białko syn-GAP jest charakterystyczne dla zagęszczeń postsynaptycznych i moduluje aktywność białka Ras o aktywności GTP-azowej, które z kolei kontroluje aktywność kinazy Raf-1, wpisanej jako jedno z pierwszych białek kaskady MAPK [31]. Białko synGAP podlega negatywnej regulacji poprzez fosforylację przez kinazę CamKII [10], co w efekcie wpływa na szybkość całego szlaku. Istnieje także możliwość modulacji ERK1,2 przez kinazę białkową C (PKC) poprzez jej oddziaływanie z kinazą Raf-1.

Ścieżka p38/SAPK łączona jest z reakcjami komórek na różnorodny stres, który prowadzi do aktywacji szlaku apoptozy. Z reakcją stresową komórek wiąże się również aktywacja szlaku JNK/SAPK, jednak jak pokazują badania mutantów pozbawionych JNK1 i 2, szlak ten jest niezbędny w procesie apoptozy rozwojowej i prawidłowego formowania układu nerwowego [9]. Kinaza JNK aktywowana jest w wyniku przekazywania sygnału poprzez co najmniej dwa różne kompleksy białkowe. Pierwszy szlak obejmuje kompleks tworzony przez białko JIP1 z kinazami MLK i MKK7, która aktywuje JNK [56]. Lokalizacja kompleksu przy powierzchni komórki sugeruje powiązanie z receptorami odbierającymi bodźce zewnątrzkomórkowe. Na podstawie badań *in vitro* istnieją dowody, że białko PSD-95, które jest typowe dla zagęszczeń postsynaptycznych, odgrywa kluczową rolę w aktywacji JNK poprzez bezpośrednie oddziaływanie z kinazą MLK [47]. JNK jest również aktywowana przez inną kinazę szlaku MAPK - MKK4, która nie łączy się z białkiem JIP, ale nie można wykluczyć obecności innych białek kompleksujących. Jednym z podstawowych substratów JNK jest jedno z białek czynnika transkrypcyjnego AP1 – białko c-Jun. Wydaje się, że zależna od fosforylacji aktywność c-Jun jest istotna w wyborze szlaku do przeżycia lub śmierci. Ostatnio coraz więcej doniesień łączy aktywność kinazy JNK z mitochondriami, sugerując, że taka lokalizacja komórkowa odgrywa istotną rolę w procesie apoptozy [12,25,29].

W wyniku krótkotrwałej ischemii mózgu obserwowana jest aktywacja zarówno prożyciowych ERK 1,2, jak i JNK [57]. Jednak równowaga pomiędzy aktywnością tych dwóch ścieżek sygnałowych jest różna w różnych rejonach hipokampa. I tak w rejonach, które nie wykazują cech uszkodzenia po niedokrwieniu (CA2, 3, zakręt zębaty), już w pierwszych godzinach po przywróceniu krążenia ilość aktywnych form ERK1,2 (P-ERK) wzrasta dwukrotnie, a po 24 godzinach aż 6-krotnie w stosunku do kontroli, i na tak wysokim poziomie utrzymuje się przez kolejne dni. We wrażliwej na niedokrwienie części CA1 przyrost ilości P-ERK1,2 nie jest istotny statystycznie i występuje przejściowo po 24 i 48 godzinach po ischemii. Jednocześnie w rejonie CA1 ilość aktywnej formy JNK (P-JNK) wzrasta w stosunku do kontroli już po 3 godzinach po niedokrwieniu i pozostaje na wysokim poziomie przez kolejne dni. W pozostałych, niewrażliwych na krótkotrwałe niedokrwienie rejonach hipokampa, wzrost ilości P-JNK występuje przejściowo, 24 godziny po przywróceniu krążenia i jest znacznie mniejszy niż ilość aktywnych form ERK1,2. Wydaje się zatem, że stres ischemiczny powoduje aktywację

obu szlaków MAPK, przy czym zmieniona zostaje równowaga pomiędzy ścieżką ERK i JNK [57]. Na podstawie obrazu morfologicznego hipokampa w 7 dni po niedokrwieniu można przypuszczać, że dominacja szlaku ERK nad ścieżką JNK w rejonach CA2, 3 i w zakręcie zębatym skutkuje „przewycięzeniem” stresu ischemicznego i promuje przeżycie.

W poszukiwaniu kolejnych etapów kaskady przekazywania sygnału ischemicznego w rejonie CA1 badano fosforylację podstawowego substratu JNK, jakim jest białko c-Jun czynnika transkrypcyjnego AP1 [57]. Wydaje się, że wzrost fosforylacji tego białka odgrywa istotną rolę w pierwszych godzinach po przywróceniu krążenia, natomiast w dłuższym czasie poziom P-c-Jun powraca do wartości kontrolnych. Ze względu na długotrwały wzrost ilości aktywnej formy JNK kolejne badania udziału tego białka w poischemicznej śmierci neuronów dotyczyły innych przypuszczalnych substratów i translokacji aktywnej kinazy do mitochondriów.

ISCHEMIA, MITOCHONDRIA I APOPTOZA

Najnowsze badania wydają się potwierdzać dawno powstałą hipotezę o kluczowej roli mitochondriów w uszkodzeniu poischemicznym [13,20]. Mitochondria oprócz swej powszechnie znanej funkcji tworzenia związków wysokoenergetycznych biorą czynny udział w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia oraz procesu apoptozy. W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że cytochrom c może, oprócz swojej funkcji w łańcuchu oddechowym, pełnić rolę aktywatora kompleksu białkowego (apoptosomu), którego składnikami są proenzymy proteolityczne – kaspazy 9 i 3. Aktywacja apoptosomu prowadzi do aktywacji kaspaz i degradacji komórki [40]. Istnieje hipoteza zakładająca udział magakanalu (MPT) występującego w błonach mitochondrialnych, w wypływie do cytoplazmy białek o niskich masach cząsteczkowych, w tym również cytochromu c i innych białek proapoptotycznych (AIF, endonukleaza G, Smac/Diablo) [45]. Jednak z doświadczeń z zastosowaniem związków zamykających kanał MPT wynika, że nie jest to jedyny mechanizm uwalniania białek z mitochondriów. W procesie tym podnoszona jest rola białek z rodziny Bcl, z których niektóre mają właściwości ochronne dla komórek (Bcl2, Bclxl), a inne sprzyjają uruchomieniu procesu apoptozy (Bax, Bid, Bad, Bik) [11,32]. Wydaje się, że białka Bcl2 i Bclxl mogą modulować otwarcie kanału MPT. Równowaga pomiędzy pro- i antyapoptotycznymi białkami z rodziny Bcl związanymi z mitochondriami może odgrywać istotną rolę w uruchamianiu kaskady proteaz. Dodatkowo, na funkcje białek z rodziny Bcl mogą wpływać modyfikacje posttranslacyjne, głównie fosforylacje przez kinazy Raf-1 i JNK. Z badań *in vitro* pochodzą przesłanki, że enzymy te mogą modulować przepuszczalność błony mitochondrialnej poprzez oddziaływanie z pro- i anty-apoptotycznymi białkami z rodziny Bcl [3,25,50]. A zatem, podobnie jak balans pomiędzy białkami z rodziny Bcl, jak i równowaga pomiędzy związanymi z błonami mitochondrialnymi aktywnymi kinazami Raf-1 i JNK może wpływać na integralność zewnętrznej błony mitochondrialnej.

W modelu opóźnionej poniedokrwiennej śmierci neuronów w hipokampie gerbilla wykazano przejściową, występującą w krótkim czasie reperfuzji (0,5–1 godziny)

obecność cytochromu c w cytoplazmie [15]. Ponownie cytochrom c w cytoplazmie wykrywany jest po 24 aż do około 72 godzin po przywróceniu krążenia, równocześnie z pierwszymi morfologicznymi oznakami śmierci neuronów. Można sugerować, że wypływ cytochromu c z mitochondriów jest czułym markerem ich uszkodzenia. Wykazano, że wczesne zastosowanie 0,5 μ M cyklospory A (CsA) ma działanie ochronne dla komórek. Cyklosporyna A jest lekiem, który prócz swojej dobrze znanej aktywności immunosupresyjnej może stabilizować błonę mitochondrialną i blokować wypływ niskocząsteczkowych białek, w tym cytochromu c. Z naszych badań *in vitro* i *in vivo* wynika, że CsA hamuje wczesną fazę wypływu cytochromu c z mitochondriów i zabezpiecza neurony rejonu CA1 hipokampa przed uszkodzeniem [15]. Natomiast zastosowanie CsA później niż 1 godzinę po przywróceniu krążenia nie chroni komórek przed śmiercią.

Postawiono zatem pytanie, czy brak neuroprotekcji przy opóźnionym podaniu CsA wiąże się z przebudową błony mitochondrialnej tak, że staje się ona niewrażliwa na ten lek?

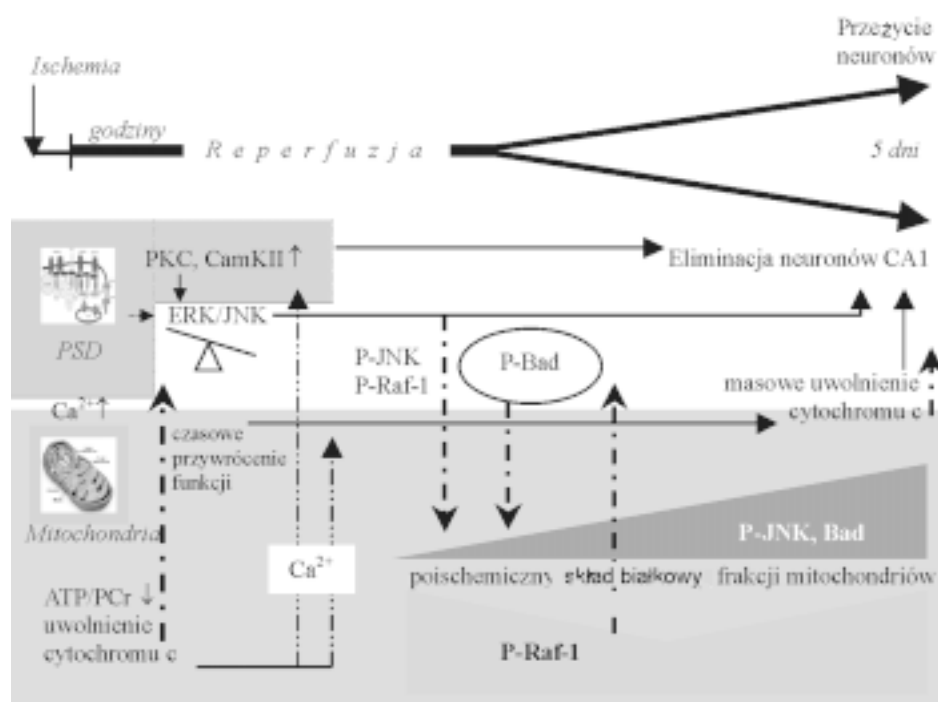
Określono poziom związanych z mitochondriami kompleksów białkowych składających się z pro-apoptycznego białka Bad i antyapoptycznego Bcl2 oraz przypuszczalnie fosforylujących je aktywnych form kinaz białkowych Raf-1 i JNK w różnym czasie po ischemii [13,57]. O ile ochronne dla komórek białko Bcl2 fizjologicznie lokalizuje się głównie w mitochondriach oraz w innych błonowych strukturach wewnątrzkomórkowych, to proapoptyczne białko Bad jest fosforylowane i pozostaje nieaktywne w cytoplazmie w kompleksie z białkiem 14-3-3 [47]. W przebiegu reperfuzji obserwowano trwały przyrost ilości białka Bad związanego z mitochondriami, z jednoczesnym, przejściowo obniżonym poziomem fosforylującej go kinazy Raf-1. Równolegle w cytoplazmie obniżała się ilość ufosforylowanej, nieaktywnej proapoptycznej formy Bad [13]. Występowanie kinazy Raf-1 w mitochondriach zostało dodatkowo potwierdzone znalezieniem kompleksu białek Bad i P-Raf-1 otrzymanych metodą koimmunoprecypitacji z preparatów oczyszczonych mitochondriów izolowanych z hipokampów gerbila. W tym samym, późnym okresie po niedokrwieniu wykazano we frakcji mitochondrialnej przyrost ilości aktywnej formy kinazy JNK [57], która może fosforylować/dezaktywować antyapoptyczne białka Bcl2 i Bclxl. Translokację białka Bad do mitochondriów potwierdziły obserwacje w mikroskopie elektronowym. Badano komórkową lokalizację białek Bad i Bcl2 metodą immunocytochemiczną z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał znakowanych cząsteczkami złota. Wykazano poniedokrwienne przemieszczenie białka Bad do mitochondriów jedynie w rejonie CA1 hipokampa, natomiast obrazy rejonu zakrętu zębatego (DG) nie wykazywały zmian lokalizacji badanych białek w przebiegu reperfuzji [13]. Wydaje się zatem, że odległe w czasie od epizodu niedokrwiennego tworzenie indukowanych bodźcem ischemicznym kompleksów Bad-Bcl2 oraz zmieniona lokalizacja komórkowa kinaz białkowych Raf-1 i JNK są elementami przebudowy błon mitochondrialnych, które stają się przepuszczalne dla cytochromu c, niezależnie od obecności cyklosporyny A. Poniedokrwienne zachwianie równowagi pomiędzy ilością ochronnej P-Raf-1 i aktywowanej stresem P-JNK może wpływać na skierowanie komórki na ścieżkę prowadzącą do śmierci poprzez uwolnienie z mitochondriów białek aktywujących kompleks apoptosomu (w tym cytochromu c) i w efekcie kaspazę 3.

PODSUMOWANIE

Przejściowe, krótkotrwałe niedokrwienie mózgu inicjuje szereg reakcji, które doprowadzają do przezwyciężenia stresu lub do eliminacji wrażliwych komórek nerwowych. Trzeba podkreślić, że szczególnie wrażliwe na ischemię są neurony rejonu CA1 hipokampa, którym przypisuje się kluczową rolę w procesie uczenia się. Dlatego niezwykle ważne jest opisanie procesów inicjowanych niedokrwieniem zarówno w komórkach przeżywających ten epizod, jak również umierających, aby można było znaleźć skuteczne sposoby ochrony tych tak istotnych dla każdego organizmu komórek. Zmiany lokalizacji wewnątrzkomórkowej białek sygnałowych (kinazy białkowe) oraz uczestniczących w procesie apoptozy (pro- i anty-apoptotyczne białka z rodziny Bcl) wpisują się w coraz bardziej skomplikowany obraz reakcji niedokrwiennej tkanki nerwowej. Sekwencja zdarzeń opisywanych w niedokrwionych komórkach wskazuje na wiele równoległe aktywowanych szlaków metabolicznych, które pozostają w ściśle określonych relacjach i oddziałują nawzajem na siebie. Próby stworzenia mapy szlaków komplikuje fakt, że ten sam enzym/białko może występować w wielu regionach komórki, gdzie pełni różne funkcje. Jednym z takich białek sygnałowych jest kinaza białkowa Raf-1; jedna z pierwszych w kaskadzie MAPK, której aktywacja zależy od białka Ras i regulacji jego aktywności. Pierwsze elementy kompleksu zlokalizowane są w zagęszczeniach postsynaptycznych (PSD). Do niedawna uważano, że jest to jedyne miejsce działania Raf-1. Obecnie wiadomo, że aktywna kinaza białkowa Raf-1 może być związana z mitochondriami, gdzie pełni różne funkcje, np. fosforyluje pro-apoptotyczne białko Bad [48] oraz co ciekawsze, tworzy kompleks z białkiem VDAC, które wchodzi w skład megakanalu i moduluje przepuszczalność kanału. Wydaje się, że dzieje się to poprzez zmiany konformacji białek kompleksu, a nie poprzez fosforylację któregoś z jego elementów ([33]. Z przeglądu piśmiennictwa wyłania się spójny obraz, że zlokalizowana mitochondrialnie kinaza Raf-1 chroni komórki przed apoptozą.

Na podstawie obserwacji własnych oraz danych z literatury można sugerować, że tworzenie się nowych, wywołanych przez krótką ischemię patologicznych kompleksów białkowych, zlokalizowanych w miejscach kontaktu synaptycznego (PSD) oraz w mitochondriach może wpływać istotnie na pro-apoptotyczne ukierunkowanie sygnału ischemicznego w okresie reperfuzji we wrażliwym rejonie CA1 hipokampa.

Zagęszczenia postsynaptyczne reagują na niedokrwienie, co objawia się bardzo szybkim, znaczącym przyrostem ilości białek i objętości struktury. Białka szkieletowe z rodziny PSD 95 stanowią „kotwicę” dla wielu kinaz białkowych (między innymi izoform PKC), które wpływają na aktywność receptorów dla neurotransmiterów z jednej strony i zmiany aktywności kaskad przekazywania sygnału do wnętrza komórek z drugiej. Istotnym elementem translokacji kinaz białkowych do PSD są jony wapnia, których stężenie w cytoplazmie zwiększa się w czasie niedokrwienia. Zmienione w wyniku przejściowego niedokrwienia kompleksy białkowe w PSD wydają się wpływać na aktywność szlaków kinaz białkowych MAPK i JNK. Wydaje się, że w komórkach CA1 hipokampa przewaga aktywności szlaku JNK stanowi istotny element procesu prowadzącego do eliminacji tych neuronów.



RYCINA 1. Schemat przedstawia zjawiska związane z ewolucją zmian wewnątrzkomórkowych prowadzących do opóźnionej, poischemicznej śmierci neuronów we wrażliwym na ischemię rejonie CA1 hipokampa. W czasie reperfuzji po 5-minutowej ischemii mózgu gerbila następuje przemieszczanie białek do zagęszczeń postsynaptycznych (PSD) oraz do i z mitochondriów. Już w trakcie niedokrwienia oraz krótkim czasie reperfuzji w PSD przyrasta ilość kinaz białkowych PKC i CamKII, natomiast w mitochondriach czasowo obserwowane jest zmniejszenie ilości aktywnej kinazy Raf-1. Jednocześnie w cytoplazmie przejściowo obserwowany jest cytochrom c. Równowaga pomiędzy aktywnymi formami kinaz ERK i JNK przychyła się w kierunku JNK. W dłuższym czasie po przywróceniu krążenia (>24 godziny) z mitochondriami związana jest coraz większa ilość kinazy JNK oraz proapoptotycznego białka Bad, a w cytoplazmie ponownie pojawia się cytochrom c: \uparrow – wzrost zawartości, \downarrow – obniżenie zawartości, \rightarrow – translokacja

Równocześnie ze zmianami składu białkowego PSD, w badanym przez nas modelu niedokrwienia mózgu gerbila obserwujemy w czasie reperfuzji dwufazowy wpływ cytochromu c z mitochondriów. Wczesny, przejściowy wpływ prawdopodobnie pełni funkcję amplifikującą sygnał prowadzący do śmierci neuronów. Długotrwały wpływ cytochromu c obserwowany od drugiej doby po przywróceniu krążenia wydaje się być związany z fazą masowej aktywacji proteaz. Wydaje się, że zmienione na skutek krótkotrwałego niedokrwienia kompleksy sygnałowych kinaz białkowych z zewnętrzną błoną mitochondrialną przyczyniają się zarówno do wczesnego, jak i późnego wypływu cytochromu c z mitochondriów, a tym samym do uruchomienia kaskady kaspaz.

Ostatnio ukazała się praca wskazująca na nową, kolejną rolę cytochromu c w przedłużaniu i rozprzestrzenianiu sygnału wzbudzonego stresem [5]. W badaniach *in vitro* wykazano, że cytochrom c łączy się z receptorami IP3 zlokalizowanymi w siateczce

śródpłazmatycznej, powoduje trwałe otwarcie kanałów błonowych i wypływ jonów wapnia do cytoplazmy. Te z kolei mogą powodować wtórne uszkodzenie mitochondriów. Koncepcja ta jest zgodna z wynikami naszych badań i wnioskami sformułowanymi na podstawie obserwacji cytochromu c niezwiązanego z mitochondriami w pierwszym okresie reperfuzji po przejściowym niedokrwieniu mózgu [15]. Ponadto, z naszych wstępnych doświadczeń *in vivo* wynika, że w krótkim czasie po przywróceniu krążenia (30 minut) po niedokrwieniu, cytochrom c związany jest z frakcją mikrosomów. Tym samym potwierdza się hipoteza o udziale cytochromu c w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnału wywołanego ischemią mózgu.

Zmiany składu białkowego zagęszczeń postsynaptycznych oraz translokacja białek do i z mitochondriów wydają się być istotnym elementem procesu opóźnionej poischemicznej śmierci neuronów. Schemat uproszczonej sekwencji przemieszczania białek sygnałowych w PSD i mitochondriach w procesie poniedokrwiennej, opóźnionej śmierci neuronów w sektorze CA1 hipokampa przedstawiono na rycinie 1.

Na podstawie przedstawionych wyników badań można pokusić się o wysnucie kilku bardziej ogólnych wniosków, które odnoszą się zarówno do procesu poischemicznej śmierci neuronów, jak i mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia procesów wewnątrzkomórkowych.

1. Przejściowa ischemia mózgu inicjuje w niedokrwionych komórkach szybkie zmiany w wewnątrzkomórkowej lokalizacji, a tym samym funkcji białek sygnałowych.

2. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa białka może określać jego aktywność i udział w odmiennych szlakach metabolicznych.

3. Wielobiałkowe kompleksy, tworząc dynamiczne struktury funkcjonalne wyższego rzędu, mogą istotnie wpływać na los komórki w odpowiedzi na stres niedokrwienno.

LITERATURA

- [1] ARONOWSKI J, GROTTA JC. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in postsynaptic densities after reversible cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1996; **709**: 103–110.
- [2] ATTWELL D, BARBOUR B, SZATKOWSKI M. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 1993; **11**: 401–407.
- [3] BAE J, HSU SY, LEO CP, ZELL K, HSUEH AJ. Underphosphorylated BAD interacts with diverse antiapoptotic Bcl-2 family proteins to regulate apoptosis. *Apoptosis* 2001; **6**: 319–330.
- [4] BERG D, HOLZMANN C, RIESS O. 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2003; **4**: 752–762.
- [5] BOEHNING D, PATTERSON RL, SEDAGHAT L, GLEBOVA NO, KUROSAKI T, SNYDER SH. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 1051–1061.
- [6] BRENNER C, KROEMER G. Apoptosis. Mitochondria – the death signal integrators. *Science* 2000; **289**: 1150–1151.
- [7] BRONISZ A, GAJKOWSKA B, DOMANSKA-JANIK K. PKC and Raf-1 inhibition-related apoptotic signalling in N2a cells. *J Neurochem* 2002; **81**: 1176–1184.
- [8] CARDELL M, BINGREN H, WIELOCH T, ZIVIN J, SAITOH T. Protein kinase C is translocated to cell membranes during cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 1990; **119**: 228–232.
- [9] CHANG L, KARIN M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; **410**: 37–40.
- [10] CHEN HJ, ROJAS-SOTO M, OGUNI A, KENNEDY MB. A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* 1998; **20**: 895–904.

- [11] CORY S, ADAMS JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 647–656.
- [12] DENG X, XIAO L, LANG W, GAO F, RUVOLO P, MAY WS, JR. Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem* 2001; **276**: 23681–23688.
- [13] DLUZNIIEWSKA J, BERSEWICZ M, WOJEWODZKA U, GAJKOWSKA B, ZABŁOCKA B. Transient cerebral ischemia induces delayed proapoptotic bad translocation to mitochondria in CA1 sector of hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; **133**: 274–280.
- [14] DOMANSKA-JANIK K, BONG P, BRONISZ-KOWALCZYK A, ZAJAC H, ZABŁOCKA B. AP1 transcriptional factor activation and its relation to apoptosis of hippocampal CA1 pyramidal neurons after transient ischemia in gerbils. *J Neurosci Res* 1999; **57**: 840–846.
- [15] DOMANSKA-JANIK K, BUZANSKA L, DLUZNIIEWSKA J, KOZŁOWSKA H, SARNOWSKA A, ZABŁOCKA B. Neuroprotection by cyclosporin A following transient brain ischemia correlates with the inhibition of the early efflux of cytochrome C to cytoplasm. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; **121**: 50–59.
- [16] DOMANSKA-JANIK K, LAZAREWICZ J, NOREMBERG K, STROSZNAJDER J, ZALEWSKA T. Metabolic disturbances of synaptosomes isolated from ischemic gerbil brain. *Neurochem Res* 1985; **10**: 649–665.
- [17] DOMANSKA-JANIK K, ZABŁOCKA B. Protein kinase C as an early and sensitive marker of ischemia-induced progressive neuronal damage in gerbil hippocampus. *Mol Chem Neuropathol* 1993; **20**: 111–123.
- [18] DOMANSKA-JANIK K, ZALEWSKA T, ZABŁOCKA B, OSTROWSKI J. Ischemia-induced modifications of protein components of rat brain postsynaptic densities. *Neurochem Int* 1999; **34**: 329–336.
- [19] FISKUM G. Involvement of mitochondria in ischemic cell injury and in regulation of intracellular calcium. *Am J Emerg Med* 1983; **1**: 147–153.
- [20] FISKUM G, MURPHY AN, BEAL MF. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; **19**: 351–369.
- [21] GADAMSKI R, MOSSAKOWSKI M.J. Asymetric damage of the CA1 sector of amon's horn after short-term forebrain ischemia in Mongolian gerbils. *Neropatologia Polska* 1992; **30**: 209–219.
- [22] GOZDZ A, HABAS A, JAWORSKI J, ZIELINSKA M, ALBRECHT J, CHLYSTUN M, JALILI A, HETMAN M. Role of N-methyl-D-aspartate receptors in the neuroprotective activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 by cisplatin. *J Biol Chem* 2003; **278**: 43663–43671.
- [23] HU BR, PARK M, MARTONE ME, FISCHER WH, ELLISMAN MH, ZIVIN JA. Assembly of proteins to postsynaptic densities after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 1998; **18**: 625–633.
- [24] HU BR, WIELOCH T. Persistent translocation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II to synaptic junctions in the vulnerable hippocampal CA1 region following transient ischemia. *J Neurochem* 1995; **64**: 277–284.
- [25] ITO Y, MISHRA NC, YOSHIDA K, KHARBANDA S, SAXENA S, KUFE D. Mitochondrial targeting of JNK/SAPK in the phorbol ester response of myeloid leukemia cells. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 794–800.
- [26] JIMENEZ B, TAPIA R. Biochemical modulation of NMDA receptors: role in conditioned taste aversion. *Neurochem Res* 2004; **29**: 161–168.
- [27] JOHNSON GL, LAPADAT R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; **298**: 1911–1912.
- [28] KENNEDY MB. Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* 2000; **290**: 750–754.
- [29] KHARBANDA S, SAXENA S, YOSHIDA K, PANDEY P, KANEKI M, WANG Q, CHENG K, CHEN YN, CAMPBELL A, SUDHA T, YUAN ZM, NARULA J, WEICHELBAUM R, NALIN C, KUFE D. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem* 2000; **275**: 322–327.
- [30] KIRINO T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1982; **239**: 57–69.
- [31] KOMIYAMA NH, WATABE AM, CARLISLE HJ, PORTER K, CHARLESWORTH P, MONTI J, STRATHDEE DJC, O'CARROLL CM, MARTIN SJ, MORRIS RGM, O'DELL TJ, GRANT SGN. SynGAP Regulates ERK/MAPK Signaling, Synaptic Plasticity, and Learning in the Complex with Postsynaptic Density 95 and NMDA Receptor. *J Neurosci* 2002; **22**: 9721–9732.
- [32] KRAJEWSKI S, MAI JK, KRAJEWSKA M, SIKORSKA M, MOSSAKOWSKI MJ, REED JC. Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci* 1995; **15**: 6364–6376.
- [33] LE MELLAY V, TROPMAIR J, BENZ R, RAPP UR. Negative regulation of mitochondrial VDAC channels by C-Raf kinase. *BMC Cell Biol* 2002; **3**: 14.
- [34] LEVY FH, KELLY DP. Regulation of ATP synthase subunit e gene expression by hypoxia: cell differentiation stage-specific control. *Am J Physiol* 1997; **272**: C457–C465.
- [35] MARTONE ME, JONES YZ, YOUNG SJ, ELLISMAN MH, ZIVIN JA, HU BR. Modification of postsynaptic densities after transient cerebral ischemia: a quantitative and three-dimensional ultrastructural study. *J Neurosci* 1999; **19**: 1988–1997.

- [36] METZGER F, KAPFHAMMER JP. Protein kinase C: its role in activity-dependent Purkinje cell dendritic development and plasticity. *Cerebellum* 2003; **2**: 206–214.
- [37] NISHIZUKA Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988; **334**: 661–665.
- [38] NISHIZUKA Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992; **258**: 607–614.
- [39] OBRENOVITCH TP, RICHARDS DA. Extracellular neurotransmitter changes in cerebral ischaemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1995; **7**: 1–54.
- [40] ORRENIUS S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett* 2004; **149**: 19–23.
- [41] PAHLMARK K, FOLBERGROVA J, SMITH ML, SIESJO BK. Effects of dimethylthiourea on selective neuronal vulnerability in forebrain ischemia in rats. *Stroke* 1993; **24**: 731–736.
- [42] PENG J, KIM MJ, CHENG D, DUONG DM, GYGI SP, SHENG M. Semiquantitative Proteomic Analysis of Rat Forebrain Postsynaptic Density Fractions by Mass Spectrometry. *J Biol Chem* 2004; **279**: 21003–21011.
- [43] PHILLIS JW, O'REGAN MH. Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. *Neurochem Int* 2003; **43**: 461–467.
- [44] ROSEN LB, GINTY DD, WEBER MJ, GREENBERG ME. Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron* 1994; **12**: 1207–1221.
- [45] SAELENS X, FESTJENS N, VANDE WL, VAN GURP M, VAN LOO G, VANDENABEELE P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; **23**: 2861–2874.
- [46] SALUJA I, O'REGAN MH, SONG D, PHILLIS JW. Activation of cPLA2, PKC, and ERKs in the rat cerebral cortex during ischemia/reperfusion. *Neurochem Res* 1999; **24**: 669–677.
- [47] SAVINAINEN A, GARCIA EP, DOROW D, MARSHALL J, LIU YF. Kainate receptor activation induces mixed lineage kinase-mediated cellular signaling cascades via post-synaptic density protein 95. *J Biol Chem* 2001; **276**: 11382–11386.
- [48] SCHEID MP, SCHUBERT KM, DURONIO V. Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem* 1999; **274**: 31108–31113.
- [49] SIESJO BK, ELMER E, JANELIDZE S, KEEP M, KRISTIAN T, OUYANG YB, UCHINO H. Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1999; **73**: 7–13.
- [50] TOURNIER C, HESS P, YANG DD, XU J, TURNER TK, NIMNUAL A, BAR-SAGI D, JONES SN, FLAVELL RA, DAVIS RJ. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000; **288**: 870–874.
- [51] TRAYSTMAN RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J* 2003; **44**: 85–95.
- [52] UEDA Y, HIRAI S, OSADA S, SUZUKI A, MIZUNO K, OHNO S. Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem* 1996; **271**: 23512–23519.
- [53] WANG HG, REED JC. Bcl-2, Raf-1 and mitochondrial regulation of apoptosis. *Biofactors* 1998; **8**: 13–16.
- [54] WIELOCH T, KAMME F. Cell signaling and ischemic neuronal death. 1998; 440–454.
- [55] WILLIAMS V, GROSSMAN RG. Ultrastructure of cortical synapses after failure of presynaptic activity in ischemia. *Anat Rec* 1970; **166**: 131–141.
- [56] YASUDA J, WHITMARSH AJ, CAVANAGH J, SHARMA M, DAVIS RJ. The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 7245–7254.
- [57] ZABLOCKA B, DLUZNIEWSKA J, ZAJAC H, DOMANSKA-JANIK K. Opposite reaction of ERK and JNK in ischemia vulnerable and resistant regions of hippocampus: involvement of mitochondria. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; **110**: 245–252.
- [58] ZABLOCKA B, GAJKOWSKA B, CZECHMANSKA T, DOMANSKA-JANIK K. Isoforms of protein kinase C in postsynaptic densities after cerebral ischemia. *Brain Res* 2001; **889**: 105–111.
- [59] ZIPFEL GJ, BABCOCK DJ, LEE JM, CHOI DW. Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. *J Neurotrauma* 2000; **17**: 857–869.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 10.05.2005 r.

Przyjęto: 22.06.2005 r.

ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa,

e-mail: zablocka@cmdik.pan.pl