

MAŁGORZATA NAŁĘCZ

WPŁYW NIEDOKRWIENIA I REPERFUZJI
NA PRZEKAŹNICTWO SYGNAŁÓW
Z MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ
W HIPOKAMPIE MÓZGU
MYSZOSKOCZKA MONGOLSKIEGO



LS 246

H 4094

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor:
Doc. dr hab. n. med. Teresa Zalewska

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego
PAN

Warszawa 2007

*Serdeczne podziękowania pragnę złożyć promotorowi mojej pracy doktorskiej **Pani Docent dr hab. Teresie Zalewskiej** za wspaniałą opiekę, wszechstronną pomoc oraz cenne wskazówki udzielone w trakcie wykonywania tej pracy a także za ogromną cierpliwość i wyrozumiałość.*

*Dziękuję również **Pani Profesor Krystynie Domańskiej-Janik** i **Pani Profesor Barbarze Łukomskiej** za cenne i wnikliwe uwagi dotyczące manuskryptu.*

*Ponadto chciałabym gorąco podziękować wszystkim **Pracownikom Zakładu Neurobiologii Naprawczej** za wspaniałą, przyjazną atmosferę. Szczególnie dziękuję **Paniom Halinie Zajac** i **Helenie Świerżyńskiej** za nieocenioną pomoc techniczną.*

Wyniki badań zawarte w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały zamieszczone w następujących publikacjach:

1. T. Zalewska, M. Ziemka-Nałęcz, A. Sarnowska, K. Domańska-Janik: **Involvement of MMPs in delayed neuronal death after global ischemia**. Acta Neurobiologiae Experimentalis (2002): 62, 53-61
2. T. Zalewska, M. Ziemka-Nałęcz, A. Sarnowska, K. Domańska-Janik: **Transient forebrain ischemia modulates signal transduction from extracellular matrix in gerbil hippocampus**. Brain Research (2003): 997, 62-69
3. M. Ziemka-Nałęcz, T. Zalewska: **Transient forebrain ischemia effects FAK-coupled signaling in gerbil hippocampus**. - Wysłane do Neurochemistry International

Przeprowadzone badania były częściowo finansowane z grantu promotorskiego nr 2P05A09928.

SPIS TREŚCI

INDEKS SKRÓTÓW	1
STRESZCZENIE	3
I. WSTĘP PRACY	7
I.1. Niedokrwienie mózgu.....	7
I.2. Szlaki przekazywania sygnałów z macierzy zewnątrzkomórkowej.....	9
I.2.1. Organizacja i właściwości macierzy zewnątrzkomórkowej.....	9
I.2.2. Metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs).....	12
I.2.2.1. Struktura molekularna metaloproteaz.....	12
I.2.2.2. Mechanizmy regulacji aktywności MMPs.....	13
I.2.2.3. Rola metaloproteaz w fizjologii i patologii OUN.....	16
I.2.3. Receptory integrynowe.....	18
I.2.4. Kinaza FAK.....	20
I.2.4.1. Struktura molekularna kinazy FAK.....	21
I.2.4.2. Drogi sygnałowe z udziałem kinazy FAK.....	23
II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	27
III. MATERIAŁ I METODY	28
III.1. Materiał doświadczalny.....	28
III.1.1. Model niedokrwienia.....	28
III.1.2. Pobieranie materiału do badań.....	29
III.2. Oznaczanie aktywności metaloproteaz: MMP-2 i MMP-9.....	29
III.2.1. Izolacja MMP-2 i MMP-9.....	29
III.2.2. Badanie aktywności metaloproteaz metodą zymograficzną.....	29
III.2.2.1. Oznaczanie aktywności metaloproteaz w ekstraktach hipokampa.....	29
III.2.2.2. Oznaczenie aktywności metaloproteaz na skrawkach metodą „sandwich”.....	30
III.2.2.3. Oznaczenie aktywności metaloproteaz metodą histochemiczną.....	31
III.3. Oznaczanie ekspresji genu kodującego <i>MMP-9</i> metodą reakcji odwrotnej transkrypcji i polimeryzacji łańcuchowej (RT-PCR).....	31
III.3.1. Izolacja całkowitego RNA.....	31
III.3.2. Synteza cDNA.....	32

III.3.3. Reakcja polimeryzacji łańcuchowej – PCR.....	32
III.4. Immunochemiczna analiza poziomu białek – Western Blot.....	33
III.4.1. Przygotowanie prób.....	33
III.4.2. Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE).....	33
III.4.3. Przenoszenie białek na błonę nitrocelulozową (elektroblotting).....	33
III.4.4. Analiza immunochemiczna.....	34
III.5. Immunoprecypitacja.....	36
III.6. Inne procedury.....	37
III.6.1. Oznaczanie stężenia białka metodą Lowry.....	37
III.6.2. Analiza statystyczna.....	37
IV. WYNIKI.....	38
IV.1. Aktywność MMP-2 i MMP-9 w hipokampie myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji.....	38
IV.1.1. Aktywność MMP-2 i MMP-9 oceniana w ekstraktach hipokampa metodą zymografii żelowej.....	38
IV.1.2. Aktywność MMP-2 i MMP-9 w skrawkach mózgu oceniana metodą zymografii <i>in situ</i>	42
IV.2. Ekspresja genu MMP-9 w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji.....	44
IV.3. Poziom lamininy w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji.....	44
IV.4. Poziom fosforylacji tyrozyny kinazy FAK w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji.....	47
IV.5. Poziom fosforylacji tyrozyny 397 kinazy FAK w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji.....	48
IV.6. Ekspresja kinazy FAK w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji.....	51
IV.7. Asocjacja kinazy FAK z kinazą Src w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji.....	52
IV.8. Poziom fosforylacji tyrozyny kinazy Src w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji.....	54
IV.9. Ekspresja kinazy Src w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji.....	55

IV.10. Asocjacja kinazy FAK z białkiem adaptorowym p130Cas w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji.....	56
IV.11. Ekspresja białka adaptorowego p130 Cas w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji.....	57
IV.12. Poziom fosforylacji tyrozyny białka adaptorowego p130Cas w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji.....	59
IV.13. Asocjacja białka adaptorowego p130 Cas z kinazą Src w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji.....	60
V. DYSKUSJA.....	62
VI. PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....	80
VII. WNIOSKI.....	81
PIŚMIENNICTWO.....	82

INDEKS SKRÓTÓW

- AP-1** - białko aktywatorowe 1, czynnik transkrypcyjny (**activatory protein 1**)
- ATP** - adenozylo trifosforan
- ATPaza** - adenozylotrifosfataza
- CA1, CA3** - róg Ammona; warstwa neuronów piramidowych hipokampa
(łac. **cornus ammonis**, ang. **Ammon's horn**)
- DG** - zakręt zębaty hipokampa (ang. **dentate gyrus**; łac. **gyrus dentatus**)
- dNTP** - trójfosforan deoksyrybonukleotydu (ang. **deoxynucleotide triphosphate**)-
- DTT** - **dithiothreitol**
- ECM** - macierz zewnątrzkomórkowa (ang. **extracellular matrix**)
- EDTA** - kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. **ethylenediaminetetraacetate**)
- EGTA** - etylenoglikolo-bis-(β -aminoetyloetero)-*N,N,N',N'*-tetraoctan (ang. **ethylene glycol bis(β -aminoethyl eter)-*N,N,N',N'*-tetraacetate**)
- ERK** - kinaza białkowa regulowana czynnikami zewnętrznymi (ang. **extracellular signal- regulated kinase**)
- FAK** - kinaza białkowa (ang. **focal adhesion kinase**)
- GAPDH** - dehydrogenaza aldehydu-3- fosfoglicerynowego (ang. **glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase**)
- GFAP** - kwaśne włókienkowe białko gleju (ang. **glial fibrillary acidic protein**)
- KA** - kwas kainowy [kwas 2-karboksy-4(1-metyloetenilo)-3-pirolidynoocowy]
(ang. **kainic acid**)
- LTP** - długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. **long term potentiation**)
- MAP-2** - białko związane z mikrotubulami (ang. **microtubule associated protein**)
- MMP** - metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. **matrix metalloproteinases**)
- MAPK** - (ang. **mitogen activated protein kinase**)
- MT-MMP** - metaloproteazy typu błonowego(ang. **membrane type matrix metalloproteinase**)
- NF κ B** - czynnik jądrowy κ B (ang. **nuclear factor κ B**)
- NO** - tlenek azotu (ang. **nitric oxide**)
- OUN** - ośrodkowy układ nerwowy

PKC	- kinaza białkowa C (ang. protein kinase C)
pro-MMP	- forma latentna (zawierająca sekwencję propeptydu) białka MMP
RT-PCR	- reakcja łańcuchowa polimerazy sprzężona z reakcją odwrotnej transkrypcji(ang. reverse transcription-polymerase chain reaction)
SDS	- siarczan dodecyłanu sodowego
SM	- stwardnienie rozsiane (ang. sclerosis multiplex)
TIMP	- tkankowy inhibitor metaloproteaz (ang. tissue inhibitor of matrix metalloproteinases)
TNF-α	- czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor)
tPA	- tkankowy aktywator plazminogenu (ang. tissue plasminogen activator)
Tris	- 2-amino-2-hydroksymetylo-propanodiol
uPA	- urokinazowy aktywator plazminogenu (ang. urokinase plasminogen activator)

STRESZCZENIE

Niedokrwienie mózgu jest jednym z najcięższych i najczęściej występujących czynników uszkadzających ośrodkowy układ nerwowy. Na podstawie danych doświadczalnych i spostrzeżeń klinicznych przyjmuje się, że zatrzymanie krążenia na okres dłuższy niż 4-5 minut prowadzi do szybkiego narastania zaburzeń czynnościowych układu nerwowego, a następnie do nieodwracalnej utraty integralności strukturalnej mózgu. Niedokrwienie mózgu poza bezpośrednią, związaną z głębokim niedoborem energetycznym martwicą tkanki, wpisaną w ostrą fazę uszkodzenia niedokrwiennego, może inicjować, po okresie pozornego powrotu funkcji, powolny proces patologiczny prowadzący do nieodwracalnych zmian i tzw. „opóźnionej” śmierci komórek nerwowych w ciągu kilku dni po przywróceniu krążenia. Opóźnioną śmierć komórek nerwowych, poza tzw. strefą półcienia (penumbra) wokół rejonu martwicy w ischemii ogniskowej, można zaobserwować w obszarach mózgu szczególnie wrażliwych na stres niedokrwienno. Do obszarów tych obok III i V warstwy kory mózgowej, prążkowiec oraz komórek Purkiniego w mózdzku należy rejon CA1 hipokampa.

Wydaje się, że mechanizm powstawania tych opóźnionych, selektywnych uszkodzeń poniedokrwienno jest wysoce specyficzny i znacznie odbiegający od tego, co obserwuje się w ostrej fazie patologii niedokrwiennej, której przedłużenie prowadzi do martwicy tkanki. Późne uszkodzenia neuronów powstają prawdopodobnie w wyniku określonej sekwencji procesów wtórnych, zaburzeń biochemicznych i molekularnych, indukowanych jedynie stresem niedokrwienno. Wystąpienie opóźnionej dysfunkcji komórek nerwowych jest typowe dla wielu form niedokrwienia, takich jak asfiksja, czy przejściowe epizody niedokrwienne tzw. TIA (transient ischemic attack). Poznanie molekularnego podłoża leżącego u podstaw tych procesów jest szczególnie istotne dla wypracowania efektywnych schematów terapeutycznych w zapobieganiu opóźnionym skutkom epizodów niedokrwienno mózgu. Zgromadzone w ostatnich latach dane eksperymentalne wskazują, że, obok szeroko dyskutowanych komórkowych mechanizmów poischemicznego uszkodzenia neuronów, równie ważne wydają się być zmiany środowiska zewnątrzkomórkowego, zaburzające kontakty komórki z otaczającą macierzą. Konsekwencją tych zdarzeń może być dodatkowa modulacja wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnałów.

Sygnaly z macierzy zewnątrzkomórkowej przekazywane są do komórki głównie przy udziale transbłonowych receptorów integrynowych. Zgodnie z sekwencją zdarzeń, opracowaną na podstawie badań *in vitro*, wiązaniu ligandów macierzy do zewnątrzkomórkowych domen integryn towarzyszy aktywacja niereceptorowych tyrozynowych kinaz białkowych, m.in. kinazy FAK i kinazy Src. Sygnał jest przekazywany na dalsze etapy w kaskadzie fosforylacji określonych substratów (białek cytoszkieletowych i białek adaptorowych), tworzących tzw. moduły sygnałowe. Reakcją o kluczowym znaczeniu jest autofosforylacja tyrozyny 397 łańcucha polipeptydowego kinazy FAK. Ufosforylowanie tej reszty jest warunkiem asocjacji kinazy FAK z jej aktywatorem jakim jest kinaza Src. Utworzenie kompleksu kinaz FAK/Src umożliwia dalszą sekwencyjną fosforylację obu kinaz, która jest równoznaczna z ich aktywacją. Aktywne kinazy mogą fosforylować kolejne substraty, włącznie z promującą przeżycie komórki kinazą ERK. Za zmianę struktury macierzy w ośrodkowym układzie nerwowym odpowiadają głównie dwie metaloproteazy: metaloproteaza 2 i metaloproteaza 9 (MMP-2 i MMP-9).

Celem podjętych przez nas badań była weryfikacja hipotezy roboczej, że w rejonie CA1 hipokampa, w którym występuje opóźniona śmierć komórek nerwowych po przejściowym niedokrwieniu przodomózgowia, dochodzi do aktywacji metaloproteaz i przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej. Określono także udział tych zmian w modulacji komórkowego szlaku przekazywania sygnału z udziałem niereceptorowej kinazy tyrozynowej FAK.

Przejściowe niedokrwienie przodomózgowia prowadzące do narastającego uszkodzenia neuronalnego głównie w rejonie CA1 hipokampa, wywoływano przez podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych u myszokoczka mongolskiego na okres pięciu minut. Przedmiotem badań były całe hipokampy lub ich fragmenty (grzbietowy, zawierający wrażliwy na niedokrwienie sektor CA1 i fragment brzuszny, odporny na niedokrwienie) oraz skrawki mózgu. Badania prowadzono przez okres trzech dni po przebytych epizodzie ischemicznym.

W kolejnych eksperymentach oznaczono aktywność zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych: metaloproteazy 2 i metaloproteazy 9 i określono poziom lamininy, jednego z białek macierzy zewnątrzkomórkowej w mózgu. Określono poziom ekspresji i aktywacji/fosforylacji kinaz FAK i Src, stopień ich wzajemnej asocjacji w przebiegu procesu poniedokrwiennej śmierci komórek oraz interakcję obu kinaz z białkiem adaptorowym p130Cas. Zbadano także poziom ekspresji i fosforylacji białka p130Cas.

Aktywność metaloproteaz oznaczano metodą zymografii żelowej oraz metodą histochemiczną. Dla oznaczenia ekspresji genu kodującego *MMP-9* zastosowano metodę odwrotnej transkrypcji i polimeryzacji łańcuchowej (RT-PCR). Poziom badanych białek w lizatach hipokampów oznaczano metodą immunochemiczną. Dla określenia stopnia interakcji białek lizaty poddawano uprzedniej immunoprecypitacji z określonym przeciwciałem specyficznym.

Uzyskane wyniki wskazują na wzrost aktywności badanych metaloproteaz w hipokampie po przywróceniu krążenia mózgowego (w czasie 48-72 godzin). Wzrost aktywności *MMP-2* występował w obu badanych strukturach hipokampa, co podaje w wątpliwość przyczynowy udział tego enzymu w opóźnionej neurodegeneracji neuronów hipokampa po krótkotrwałym stresie ischemicznym. Natomiast ograniczona do rejonu CA1 aktywacja *MMP-9* może stanowić istotny element poischemicznych zmian neurodegeneracyjnych. Przemawia za tym także czasowa i topograficzna zbieżność wzrostu aktywności *MMP-9* i degradacji lamininy – białka macierzy zewnątrzkomórkowej.

Logicznym ciągiem podjętych przez nas badań było sprawdzenie, czy wywołane niedokrwieniem przemodelowanie struktury macierzy prowadzi do modulacji wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania. W tym celu określiliśmy poziomy autofosforylacji Tyr397, uznanej za kluczowy etap przekazu sygnału z macierzy. Wyniki uzyskane w toku naszych badań wskazują na obniżenie poziomu fosfotyrozyny 397 kinazy FAK we fragmencie CA1 hipokampa. Bezpośrednią konsekwencją procesu defosforylacji było osłabienie zdolności kinazy FAK do interakcji z kinazą Src.

Wydaje się, że modulacja dróg sygnałowych związanych z fosforylacją kinazy FAK po wewnętrznej stronie błony komórkowej jest pochodną nadmiernej aktywacji zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych, przebudowy macierzy i zmiany sygnału integrynowego. Wskazywać na to może korelacja czasowo - przestrzenna opisanych zdarzeń. Interesującą obserwacją dokonaną w toku naszych badań jest fakt, że indukowany niedokrwieniem spadek aktywności katalitycznej kinazy FAK był zbieżny nie tylko ze zmniejszeniem stopnia aktywacji/fosforylacji, ale również z obniżeniem ilości białka enzymatycznego w wyniku jego degradacji proteolitycznej. Oba procesy przebiegają w tym samym czasie i mogą być wzajemnie od siebie zależne. Obniżenie ilości białka miało także miejsce w przypadku kinazy Src. Na podstawie prezentowanych wyników można wnioskować, że obok procesu fosforylacji uważanej za najważniejszy mechanizm regulacji przekazywania sygnałów przez kinazę FAK, proteolityczna degradacja kinaz wydaje się odgrywać równie ważną rolę w ewolucji zmian poniedokrwieniowych.

Na tle obniżonej aktywności katalitycznej i redukcji poziomu białka FAK po epizodzie niedokrwinnym zaskakuje brak zmian asocjacji tej kinazy z białkiem adaptorowym p130 Cas. Istniejący stan wiedzy nie pozwala na precyzyjne określenie roli, jaką odgrywa ten kompleks w hipokampie po niedokrwieniu. Zgodnie z wynikami badań *in vitro* asocjacja tych białek prowadzi do aktywacji kinazy ERK, natomiast indukowany sygnał byłby tutaj zbyt słaby dla ochrony neuronów przed uszkodzeniem ischemicznym *in vivo*.

Uzyskane wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Niedokrwienie przodomózgowia myszokoczka mongolskiego prowadzi do proteolitycznej przebudowy struktury macierzy zewnątrzkomórkowej w rejonie CA1 hipokampa w wyniku aktywacji metaloproteazy 9.
2. Przemodelowaniu macierzy zewnątrzkomórkowej towarzyszy osłabienie kontaktu komórki z otaczającym środowiskiem i modulacja wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału z macierzy, wykładnikiem której jest zahamowanie aktywności kinazy FAK i jej asocjacji z kinazą Src.
3. Poischemiczna degradacja proteolityczna kinazy FAK i Src pogłębia dodatkowo stopień zahamowania tej ważnej ścieżki sygnałowej z macierzy zewnątrzkomórkowej.
4. Wyłączenie kompleksu kinaz FAK/Src ze szlaku przekazywania w hipokampie może prowadzić do osłabienia zdolności adaptacyjnych komórki i być jedną z przyczyn opóźnionej śmierci neuronów po przejściowym niedokrwieniu mózgu myszokoczka mongolskiego.

I. WSTĘP

I.1. Niedokrwienie mózgu

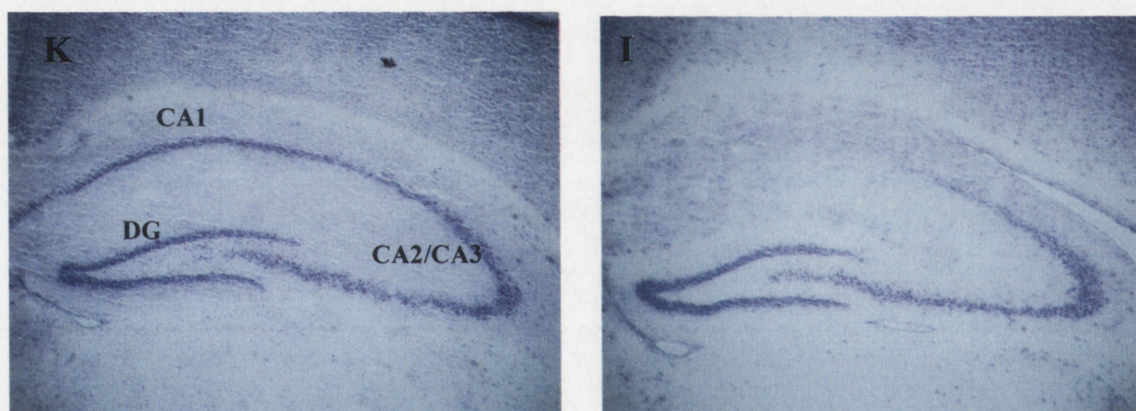
Niedokrwienie (ischemia) mózgu jest jednym z najcięższych i najczęściej występujących czynników uszkadzających ośrodkowy układ nerwowy (OUN). Na podstawie danych doświadczalnych i spostrzeżeń klinicznych przyjmuje się, że w wyniku zatrzymania krążenia na okres dłuższy niż 4-5 minut dochodzi do szybkiego narastania zaburzeń czynnościowych układu nerwowego, a następnie do utraty integralności strukturalnej mózgu.

Do grupy neuronów najbardziej wrażliwych na niedokrwienie należą neurony hipokampa (głównie rejony CA1 i CA3 oraz wzniesienie zakrętu zębatego), III i V warstwy kory mózgowej, komórki prądkowia oraz komórki Purkiniego w mózdzku (Kirino 1982, Kirino i Sano 1984, Pulsinelli 1985, Collins i wsp. 1989). W tych strukturach zmiany morfologiczne zaobserwować można już w ciągu kilku minut po zakończeniu epizodu ischemicznego, jeśli skutkuje on nieodwracalnym wyczerpaniem rezerw energetycznych.

Istnieje pełna zgodność, że bezpośrednią przyczyną ostrej fazy uszkodzenia neuronalnego jest głęboki kryzys energetyczny, prowadzący do zaburzenia homeostazy komórkowej (Siesjo 1992, 1993). Całkowite niedokrwienie 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 zamkniętego, w którym tkanka może uzyskać energię wyłącznie kosztem endogennych zasobów związków wysokoenergetycznych - ATP i fosfokreatyny oraz z beztlenowych przemian komórkowych zapasów glukozy i glikogenu. Ograniczona ilość tych zasobów, niska wydajność energetyczna beztlenowych przemian glukozy oraz szybkie zużycie endogennych związków wysokoenergetycznych przez mózg prowadzi do upośledzenia energetyki komórki.

Konsekwencją niedoboru energetycznego jest cały szereg procesów wtórnych, takich jak utrata potencjału błonowego, depolaryzacja błon, uwolnienie neuroprzekaźników z zakończeń presynaptycznych, w tym aminokwasów pobudzających, aktywacja ich receptorów, zaburzenie homeostazy jonowej, obniżenie wewnątrzkomórkowego pH, zahamowanie zależnych od energii szlaków syntezy związków wielkocząsteczkowych. Każdy z wymienionych procesów może przyczynić się do ograniczenia przeżywalności komórek nerwowych.

Niedokrwienie mózgu poza bezpośrednią, związaną z głębokim niedoborem energetycznym martwicą tkanki, wpisaną w ostrą fazę uszkodzenia ischemicznego, może indukować często jedynie w określonych okolicach mózgu, po okresie pozornego powrotu funkcji tzw. „opóźnioną” śmierć komórek nerwowych, nawet w ciągu kilku dni po przywróceniu krążenia (Kirino 1982, Pulsinelli i wsp. 1982). W przeciwieństwie do uszkodzenia ostrego, które nie wykazuje specyficzności w stosunku do struktur czy subpopulacji komórkowych, opóźniona śmierć komórek po krótkich epizodach ischemicznych (5 - 15 minut) występuje wybiórczo w neuronach zlokalizowanych w strukturach mózgu wrażliwych na niedokrwienie, np. w rejonie CA1 hipokampa (Kirino 1982, Kirino i Sano 1984, Pulsinelli 1985, Gadamski i Mossakowski 1992). Pierwsze zmiany morfologiczne są widoczne już w czasie 6-24 godzin po przywróceniu krążenia i w zależności od charakteru i stopnia niedokrwienia zmiany degeneracyjne mogą pogłębiać się nawet w ciągu kilku dni (Ryc.1).



Rycina 1. Przekrój hipokampa mózgu myszokoczka mongolskiego kontrolnego (K) oraz po niedokrwieniu i 72 godzinach reperfuzji (I); barwienie hematoksylina-eozyna. Widoczne wyraźne poniedokrwienne uszkodzenie komórek sektora CA1 (część grzbietowa hipokampa) przy braku zmian w rejonie CA2/CA3 i zakręcie zębatym (DG).

Mechanizm powstawania opóźnionych, selektywnych uszkodzeń poniedokrwiennych jest wysoce specyficzny i znacznie odbiegający od tego, co obserwuje się w ostrej fazie patologii poniedokrwiennej. Zagadnienie to jest tym bardziej intrygujące, że w okresie pogłębiania się późnych zmian poniedokrwiennych przepływ krwi przez mózg nie odbiega od warunków kontrolnych (Suzuki i wsp. 1983). Nie obserwuje się także większych zakłóceń metabolizmu energetycznego, homeostazy jonów sodu, potasu i zawartości wody (Pulsinelli i Duffy 1982, Arai i wsp. 1986). Powrót zdolności tkanki nerwowej do syntezy związków wysokoenergetycznych i wielkocząsteczkowych stwarza co prawda możliwość naprawy

uszkodzeń spowodowanych zatrzymaniem dopływu krwi, jednak nie zawsze i z przyczyn nie do końca poznanych, proces ten prowadzi do ponownego podjęcia funkcji przez komórki nerwowe.

W okresie oddzielającym epizod ischemiczny od ostatecznej eliminacji wrażliwych na niedokrwienie komórek, zachodzi wiele wtórnych zaburzeń biochemicznych i molekularnych, które mogą wpływać bezpośrednio lub pośrednio na wystąpienie opóźnionej śmierci neuronów. Istnieją liczne przesłanki wskazujące, że sygnałem inicjującym łańcuch zdarzeń prowadzących do opóźnionej neurodegeneracji jest toksyczność wewnątrzkomórkowych stężeń wapnia osiągniętych w czasie ischemii. Uaktywnienie kanałów wapniowych zarówno tych związanych z pobudzeniem receptorów glutaminianergicznymi jak i kanałów zależnych od potencjału, a także uwolnienie wapnia wewnątrzkomórkowego powoduje wzrost stężenia tego jonu w cytosolu a następnie aktywację licznych wapniowo-zależnych układów enzymatycznych – proteaz, lipaz, kinaz, endonukleaz (Łazarewicz i wsp. 1978, Siesjo i Bengtsson 1989, Choi 1992, Zalewska i wsp. 1996, 1998). W następstwie tych procesów dochodzi do zmian w obrębie cytoszkieletu komórki, zaburzenia wewnątrzkomórkowych procesów fosforylacji, aktywacji syntazy NO i powstawania wolnych rodników oraz zwiększenia ekspresji genów (m.in. genów wczesnej odpowiedzi tkankowej, białek szoku cieplnego, cytokin, czynników wzrostu) (Barone i Feuerstein 1999).

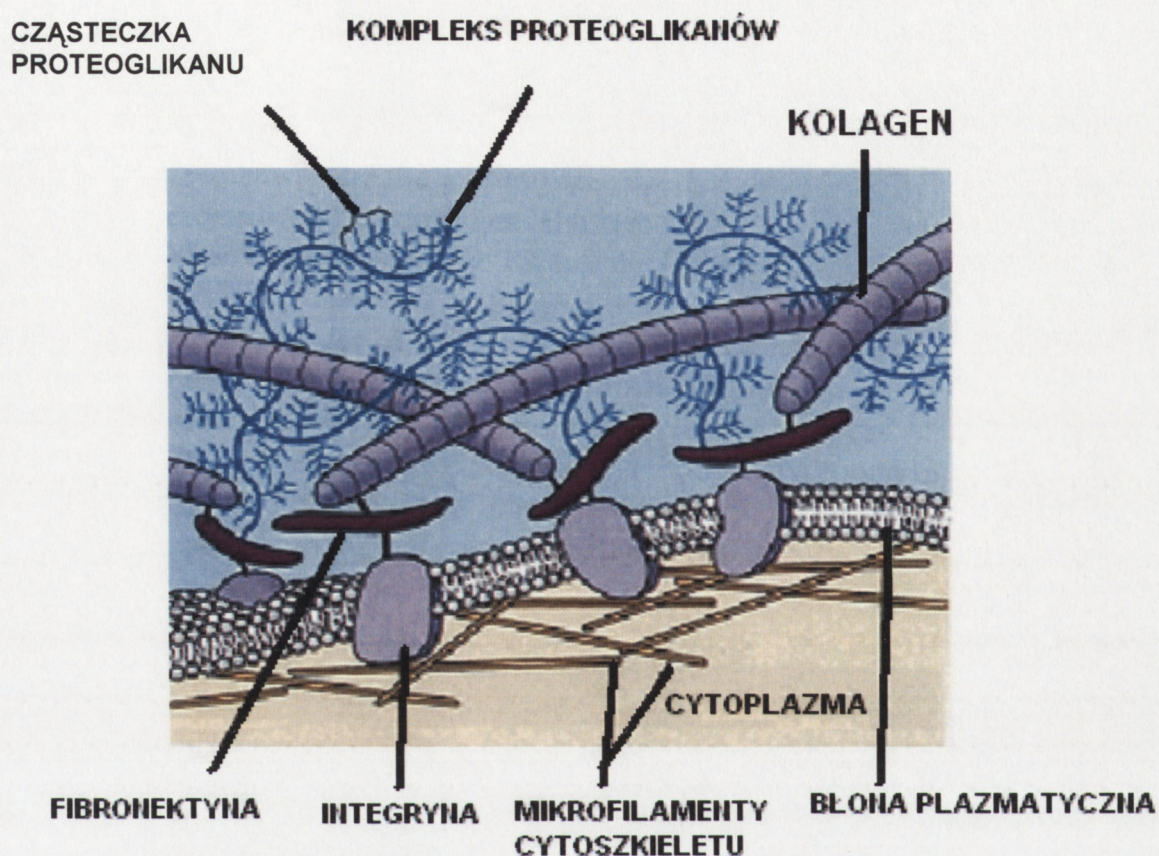
W coraz bardziej komplikującym się obrazie wzajemnych połączeń i współzależności reakcji poischemicznych, znaczącą rolę wydają się pełnić zaburzenia środowiska zewnątrzkomórkowego niosące za sobą zmianę koniecznego dla życia, prawidłowego kontaktu komórki z macierzą zewnątrzkomórkową. Konsekwencją tych zdarzeń może być dodatkowa modulacja wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnałów.

I.2. Szlaki przekazywania sygnałów z macierzy zewnątrzkomórkowej

I.2.1. Organizacja i właściwości macierzy zewnątrzkomórkowej

Podstawowym elementem, stanowiącym zrab dla strukturalnej organizacji połączeń komórek OUN, jest macierz zewnątrzkomórkowa (ang. extracellular matrix, ECM). Stanowi ona około 20% całkowitej objętości mózgu. Strukturę macierzy tworzą trzy różne typy białek. Są to białka strukturalne (kolagen, elastyna), białka tworzące kompleksy z polisacharydami (proteoglikany, głównie zawierające łańcuchy siarczanu chondroityny) i glikoproteiny adhezyjne (fibronektyna, laminina, witronektyna, tenascyna). Polisacharydy wchodzące w skład macierzy zewnątrzkomórkowej są przeważnie glikozaminoglikanami, które łącząc się

kowalencyjnie z rdzeniem białkowym tworzą proteoglikany. Wyjątek stanowi kwas hialuronowy, który występuje w stanie wolnym (Ryc.2).



Rycina 2. Schemat budowy macierzy zewnątrzkomórkowej (na podstawie ryciny zamieszczonej na stronie internetowej: <http://io.uwinnipeg.ca/~simmons/Cell%20Tour/img025.jpg>.)

Skład macierzy zewnątrzkomórkowej różni się w zależności od rodzaju tkanki. Macierz zewnątrzkomórkowa tkanki nerwowej zawiera stosunkowo niewiele białek włóknkowych takich jak kolagen czy fibronektyna, natomiast dużo hialuronianu i proteoglikanów (Novak i Kaye 2000). Specyficznymi dla mózgu są dwie glikoproteiny - neurokan (Rauch i wsp. 1992) i brewikan (Yamada i wsp. 1994). Szczególną formą macierzy, powstałą na skutek agregacji niektórych jej składników, są sieci okołoneuronalne. Są to siatkowate struktury otaczające ciała komórek nerwowych oraz miejsca kontaktów synaptycznych, które tworzą swego rodzaju izolację dla poszczególnych neuronów (Celio i Blumcke 1994).

O prawidłowym zespoleniu komórek z macierzą zewnątrzkomórkową decydują glikoproteiny adhezyjne. Wiążą się one z receptorami obecnymi na powierzchni komórki przy udziale sekwencji RGD (arginina, glicyna, kwas asparaginowy) łańcucha polipeptydowego.

Macierz zewnątrzkomórkowa dzięki własnościom fizycznym jej elementów, takich jak hydrofilność, łatwość tworzenia żeli i odporność na działanie sił ściskających polisacharydów oraz odporność na rozciąganie białek włókiennkowych, zapewnia stabilność mechaniczną i utrzymanie przestrzennej organizacji tkanki.

Rola macierzy zewnątrzkomórkowej nie ogranicza się wyłącznie do tworzenia podpory dla komórek nerwowych. Stanowi ona równocześnie „magazyn” cząsteczek sygnałowych takich jak cytokiny oraz czynniki wzrostu (Venstrom i Reichardt 1993, Giancotti i Rouslahti 1999, Petitsclerc i wsp. 2000, Sternlicht i Werb 2001).

Sygnaly z macierzy zewnątrzkomórkowej są przekazywane do komórki za pośrednictwem receptorów integrynowych. Przyłączenie liganda do receptora integrynowego jest sygnałem inicjującym asocjację domen cytoplazmatycznych tego receptora z białkami cytoszkieletowymi, adaptorowymi i białkowymi kinazami tyrozynowymi. W ten sposób po obu stronach błony tworzą się agregaty złożone z białka macierzy, integryny i wymienionych białek wewnątrzkomórkowych. Noszą one nazwę miejsc kontaktu lub przylegania. W OUN nie stwierdzono obecności struktur przypominających „klasyczne” miejsca adhezyjne. Miejscem szczególnego kontaktu pomiędzy komórkami neuronalnymi a substancją zewnątrzkomórkową są błony postsynaptyczne. Na błonach tych zlokalizowane są dynamiczne kompleksy białek uczestniczących w przekazywaniu sygnałów z macierzy (Husi i Grant 2001).

Wydaje się, że macierz zewnątrzkomórkowa odgrywa istotną rolę w funkcjonalnym dojrzewaniu neuronów, w regulacji procesu synaptogenezy (Bandtlow i Zimmermann 2000, Corveti i Rossi 2005, Luo 2005, Mayer i wsp. 2005) oraz w procesach plastyczności neuronalnej. Niektóre z proteoglikanów wpływają na długotrwałe wzmocnienie i osłabienie synaptyczne (LTP, LTD) (Lauri i wsp. 1999). Badania wykazały, że enzymatyczne usunięcie siarczanu chondroityny osłabiało zarówno LTP i LTD w rejonie CA1 hipokampa (Bukalo i wsp. 2001). Podobne osłabienie LTP obserwowano także u myszy pozbawionych glikoproteiny adhezyjnej tenascyny (Saghatelian i wsp. 2001).

Na podstawie analizy istniejących danych można wnioskować, że prawidłowa interakcja obu przedziałów: zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego jest warunkiem niezbędnym dla właściwego przebiegu komórkowych procesów biologicznych. Warunkiem współdziałania komórki z otaczającym ją środowiskiem jest właściwe ukształtowanie ECM.

Istnieje pełna zgodność, że kluczową rolę w modelowaniu struktury macierzy pełnią zewnątrzkomórkowe enzymy proteolityczne należące do klasy metaloproteaz.

I.2.2. Metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs)

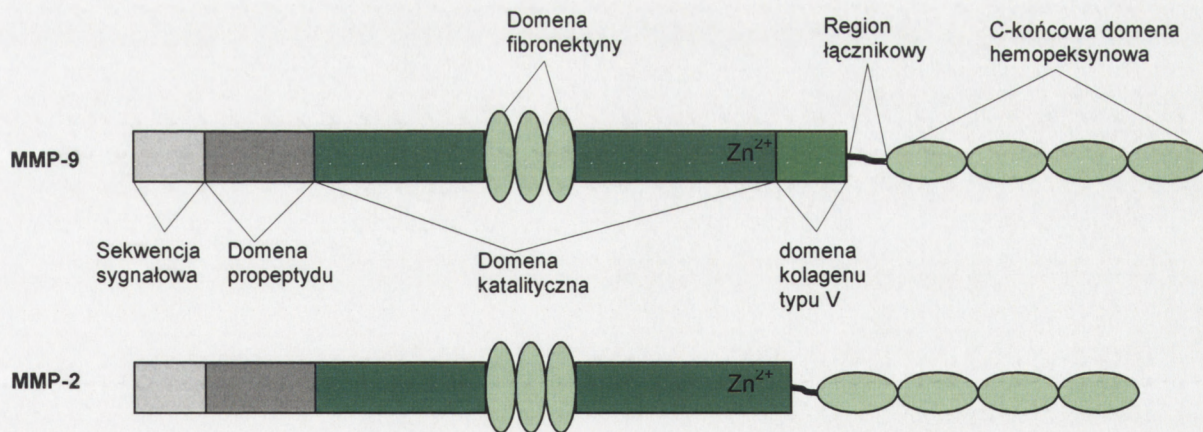
Metaloproteazy (ang. *metalloproteinases*, MMP's) stanowią grupę zależnych od Zn^{2+} egzoptydaz, których podstawową funkcją jest proteoliza białek ECM. Enzymy te syntetyzowane są w komórkach i w formie proenzymów uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie ulegają aktywacji. Dotychczas poznano 25 metaloproteaz, tworzących 4 odrębne grupy. Są to: kolagenazy, żelatynazy, stromielizyny oraz metaloproteazy związane z błoną komórkową. Podstawą klasyfikacji metaloproteaz było podobieństwo budowy molekularnej i podobne preferencje substratowe (Nagase i Woessner 1999, Sternlicht i Bergers 2000, Sternlicht i Werb 2001). Zdolność tych enzymów do przebudowy ECM wymaganej dla prawidłowego przebiegu rozwoju zarodkowego i morfogenezy tkanek sugeruje, że metaloproteazy pełnią istotną rolę w przebiegu podstawowych procesów biologicznych (Vu i Werb 2000). Rosnąca liczba dowodów wskazuje na udział tych enzymów w regulacji procesów związanych z przeżyciem i angiogenezą. Uwolnienie, aktywacja lub zahamowanie niektórych cząsteczek sygnałowych (np. czynników wzrostu) jak i powierzchniowych receptorów komórki w wyniku ograniczonej proteolizy, świadczy o zaangażowaniu tych enzymów w przekazywanie sygnałów (Sternlicht i Werb 2001, Szklarczyk i wsp. 2002). Jednakże udział licznych substratów MMPs w szerokim spektrum reakcji biochemicznych uniemożliwia precyzyjne ustalenie ich roli fizjologicznej.

I.2.2.1. Struktura molekularna metaloproteaz

Większość znanych metaloproteaz składa się z 5 podstawowych domen białkowych, co ilustruje zamieszczony niżej schemat budowy MMPs (Ryc.3). Pierwsza z nich, zwana sekwencją sygnałową, znajduje się na końcu aminowym łańcucha polipeptydowego. Domena ta decyduje o sekrecji proenzymu z siateczki śródplazmatycznej do macierzy zewnątrzkomórkowej i ulega proteolizie na błonie komórkowej. Następną domeną, licząc od końca aminowego proenzymu, jest domena propeptydowa (licząca około 80 aminokwasów), charakteryzująca się unikalną konserwatywną sekwencją Pro-Arg-Cys-Gly(Val-/Asn-)Pro-Asp-. Ulokowana wewnątrz tej sekwencji cysteina wiąże poprzez grupę SH konieczny dla aktywacji enzymu jon cynku, utrzymując w ten sposób enzym w stanie nieaktywnym.

Kolejną domeną jest domena katalityczna, złożona z około 170 aminokwasów. Zawiera ona stosunkowo krótką, konserwatywną sekwencję His-Glu-X-X-His-X-X-Gly-X-X-His, która przy udziale obecnych w łańcuchu trzech reszt histydyny (His-) wiąże atom cynku i tworzy centrum aktywne enzymu (Nagase i Woessner 1999). Pomiedzy domeną katalityczną a końcem karboksylowym jest odcinek polipeptydowy o różnej długości u poszczególnych MMPs pełniący funkcję "łącznika" (ang. hinge region). Określa on specyficzność substratową enzymów (Kojima i wsp. 2000, Sterlicht i Werb 2001). Ostatnia z domen (licząca około 210 aminokwasów), umiejscowiona na końcu karboksylowym, ma strukturę podobną do hemopeksyny (ang. hemopexin-like domain). Domena ta u większości metaloproteaz zaangażowana jest w wiązanie białek macierzy (Roeb i wsp. 2002).

Nie wszystkie poznane metaloproteazy mają ten sam schemat budowy molekularnej. Przykładem mogą być enzymy należące do grupy żelatynaz: żelatynaza A (MMP-2) oraz żelatynaza B (MMP-9). Zgodnie z przedstawionym schematem, mają one trzy powtarzające się odcinki peptydowe typu fibronektyny (ang. fibronectin-type II domain) wbudowane w domenę katalityczną; biorą one udział w połączeniu enzymu z kolagenem i elastyną. Metaloproteaza 9 ma jeszcze dodatkową domenę kolagenu typu V (Murphy i wsp. 1994, Shipley i wsp. 1996).



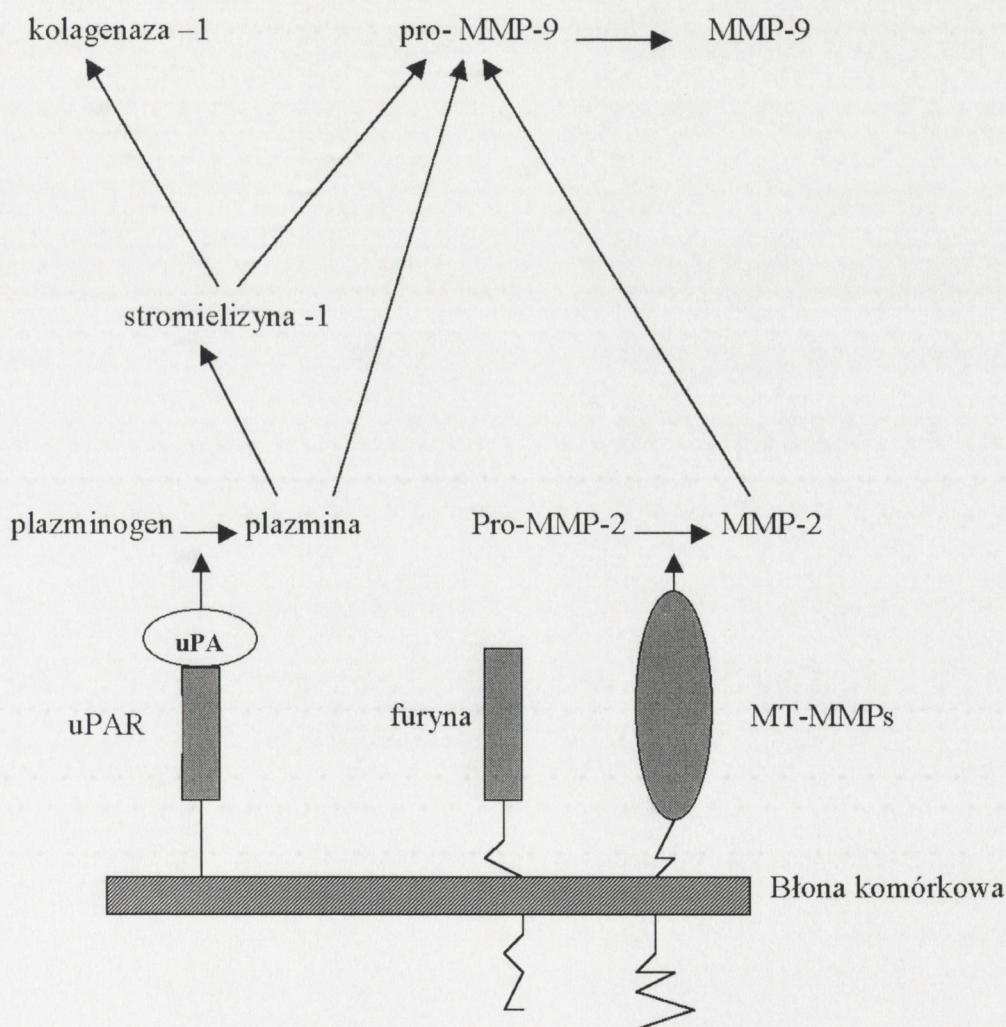
Rycina 3. Schemat budowy wybranych metaloproteaz (MMP-9 i MMP-2) z rodziny żelatynaz

I.2.2.2. Mechanizmy regulacji aktywności MMPs

Aktywność metaloproteaz w warunkach fizjologicznych podlega ścisłej, wielopoziomowej regulacji, zarówno na etapie transkrypcji genów, translacji, aktywacji przez odcięcie sekwencji proenzymu oraz przez specyficzne inhibitory tkankowe.

Jednym z głównych mechanizmów regulacji metaloproteaz jest transkrypcja genów. Badania *in vitro* wykazały stymulację transkrypcji genów licznych metaloproteaz przez

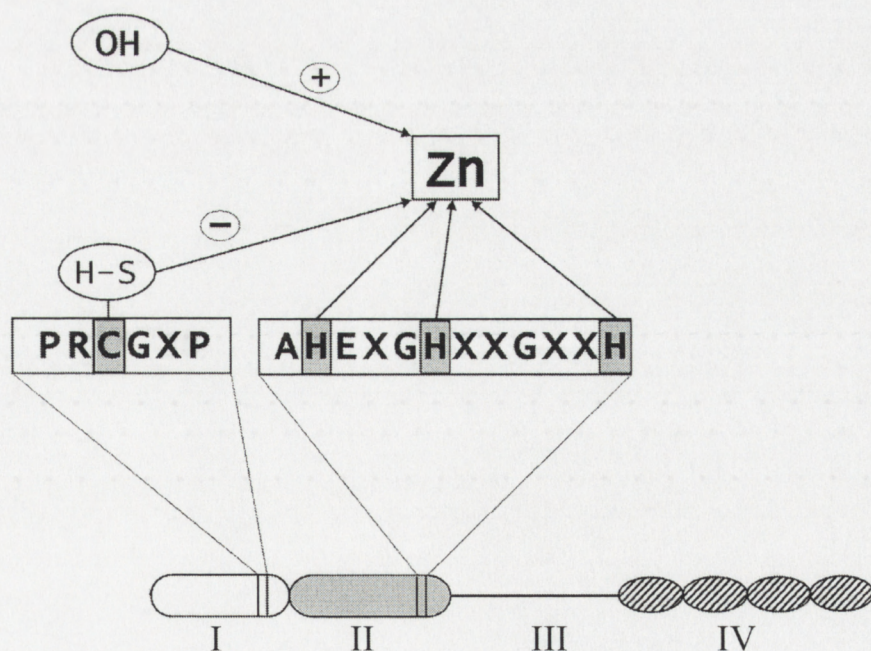
czynniki wzrostu, cytokiny, estry forbolu, kinazę białkową C i onkogeny. Czynniki te indukują ekspresję protoonkogenów *fos* i *jun*, których produkty tworzą dimery funkcjonujące jako czynniki transkrypcyjne AP-1. AP-1 wiąże się do specyficznej sekwencji DNA w rejonie promotorowym genu i stymuluje proces transkrypcji np. genu *MMP-9* (Fini i wsp. 1998, Leppert i wsp. 1998). W regulację ekspresji *MMP-9* mogą być zaangażowane również inne czynniki transkrypcyjne, na przykład NFκB i Sp-1 (Huhtala i wsp. 1990). Region promotorowy genu konstytutywnej *MMP-2* posiada miejsce wiążące czynnik AP-2 (Huhtala i wsp. 1991). W przyłączeniu AP-2 do DNA pośredniczy kinaza białkowa A (zależna od cAMP), kinaza białkowa C oraz estry forbolu. Ekspresję genów metaloproteaz indukują także wiązanie białek ECM do receptorów integrynowych (Sternlicht i Werb, 2001).



Rycina 4. Schemat aktywacji MMP-2 i MMP-9: uPA – urokinazowy aktywator plazminogenu, uPAR – receptor uPA, MT-MMPs - metaloproteazy typu błonowego (wg. Yong i wsp. 1998)

Metaloproteazy są syntetyzowane jako pre-proenzymy i po odcięciu domeny sygnałowej większość z nich jest wydzielana na zewnątrz komórek jako nieaktywny proteolitycznie zymogen. Domena propeptydowa utrzymuje MMPs w formie proenzymu i jest odcinana w czasie aktywacji, odsłaniając jon cynku. Schemat aktywacji dwóch kluczowych metaloproteaz: MMP-2 i MMP-9 przedstawia rycina 4. Zgodnie z poglądami licznych grup badaczy aktywatorem MMP-9 (żelatynazy B) mogą być inne proteazy, takie jak MMP-2, stromielizyna lub powstająca z plazminogenu plazmina (Yong i wsp 1998). Natomiast za aktywację metaloproteazy 2 (żelatynazy A) odpowiadać ma metaloproteaza błonowa - MT1-MMP. Asocjacja proenzymu MMP-2 z MT1-MMP prowadzi do jego aktywacji (Ryc.4). Potranslacyjna aktywacja MMP-9 może być również wynikiem s-nitrozylacji tego białka. (Gu i wsp. 2002).

W układach bezkomórkowych proenzymy są aktywowane także przez takie czynniki jak SDS, mocznik, niskie pH, czy wysoka temperatura (Sternlicht i Werb 2001). Dochodzi wtedy do przejściowej dysocjacji połączenia cysteina-cynk, a grupa SH cysteiny zostaje zastąpiona zhydrolizowaną cząsteczką wody (tzw. „cystein switch”) (Ryc.5). Taka modyfikacja uniemożliwia ponowne połączenie cysteiny z jonem cynku a domena propeptydu jest usuwana w wyniku autokatalizy bądź też ograniczonej proteolizy przy udziale innych enzymów (Nagase, 1997).



Rycina 5. Schemat aktywacji metaloproteaz, tzw. „cystein switch”: I – domena propeptydu, II – domena katalityczna; III – region łącznikowy; IV – domena hemopeksyny (wg. Cuzner i wsp. 1999)

Mechanizmy aktywacji poszczególnych enzymów należących do rodziny metaloproteaz nie są jeszcze do końca poznane. Prawdopodobnie zależą one od typu badanych komórek.

Aktywność proteolityczna metaloproteaz jest regulowana także przez specyficzne inhibitory tkankowe (ang. tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP), które tworzą ścisłe, niekowalencyjne połączenia z enzymami, w stosunku stechiometrycznym 1:1. Do chwili obecnej poznano 4 inhibitory tkankowe metaloproteaz. Są to białka o ciężarze 21-30 kDa, zbudowane z dwóch podstawowych domen. Domenę N-końcową tworzy odcinek polipeptydowy (homologiczny u wszystkich 4 inhibitorów), który oddziałuje z centrum aktywnym enzymów, blokując ich działanie. Domena C-końcowa poszczególnych inhibitorów charakteryzuje się większą zmiennością. Wpływa ona na połączenie inhibitora z fragmentem polipeptydowym metaloproteaz o charakterze hemopeksyny (Blavier i wsp. 1999). Poszczególne TIMPs charakteryzują się różnym stopniem specyficzności dla poszczególnych metaloproteaz. Na przykład TIMP-1 hamuje aktywność MMP-9, a TIMP-2 – MMP-2. Zadaniem endogennych inhibitorów MMPs jest kontrola degradacji ECM w komórkach (Nagase 1997, Woessner i Nagase 2000, Sternlich i Werb 2001).

1.2.2.3. Rola metaloproteaz w fizjologii i patologii OUN

Jak już wspomniano, metaloproteazy są włączone w procesy związane z rozwojem i dojrzewaniem układu nerwowego. Udział poszczególnych MMPs w procesach proliferacji, migracji czy morfogenezy wykazuje znaczne różnice na poszczególnych etapach rozwoju u różnych gatunków. Wykazano, iż w migrację przeszczepianych do prądkowia mózgu noworodków myszy komórek astrogleju izolowanych z zarodka królika zaangażowana jest MMP-1 (Del Bigio i wsp. 1999). Natomiast migracja komórek progenitorowych oligodendrocytów wymaga aktywacji MMP-2 (Yong i wsp. 2001). Podwyższoną ekspresję MMP-2 stwierdzono także w hodowlach neuralnych komórek macierzystych oraz w komórkach progenitorowych różnicujących w astroglej i neurony (Frolichsthal-Schoeller i wsp. 1999, Yong i wsp. 2001).

Sugerowany jest udział metaloproteaz we wzroście neurytów w czasie rozwoju ontogenetycznego. Stymulację ekspresji MMP-2, -3, -9 obserwowano w hodowli komórek neuroblastomy i PC12 po dodaniu do pożywek hodowlanych aktywatorów różnicowania neuronalnego i wzrostu aksonu takich jak NGF (nerve growth factor), laminina, kwas retinowy (Chambaut-Guerlin i wsp. 2000).

Wysoki poziom żelatynaz obserwowano w rozwijającym się mózdzku szczura z maksymalną ekspresją MMP-9 w 15 dniu życia (Vaillant i wsp. 1999). Autorzy postulują włączenie tego enzymu w intensywnie przebiegającą w tym czasie synaptogenezę. Obecność MMP-9 w wypustkach oligodendrocytów oraz hamowanie ich wzrostu przez inhibicję MMPs wskazuje na udział metaloproteaz w procesie mielinizacji (Oh i wsp 1999).

Zdolność MMPs do proteolizy neurotrofin – proNGF i proBDNF może wskazywać pośrednio na rolę MMPs w plastyczności neuronalnej. Jednym z przekonujących dowodów jest zdolność tych enzymów do proteolizy β -dystroglikanu, który jak sugeruje Kaczmarek i wsp. (2002) może pełnić ważną rolę w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym - molekularnym modelu procesów uczenia i pamięci.

Aktywność metaloproteaz w warunkach fizjologicznych podlega ściśle wielopoziomowej regulacji. Zaburzenie mechanizmów kontrolnych i nadmierna aktywacja zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych towarzyszy licznym stanom patologicznym OUN. Znaczącą aktywację metaloproteaz w tkance nerwowej obserwowano między innymi w patologii niedokrwiennej mózgu i rdzenia, arteriosklerozie, w przewlekłych chorobach zwyrodnieniowych – stwardnieniu rozsianym (SM) i w chorobie Alzheimera oraz w chorobach nowotworowych.

Wykonane *post mortem* badania immunohistochemiczne tkanki nerwowej chorych na SM wykazały podwyższoną ekspresję MMPs (MMP-2, -3, -7, -9) w obszarach mózgu objętych przewlekłym procesem zapalnym (Cuzner i wsp 1996, Anthony i wsp. 1997, Lo i wsp. 2002). Wzrost ekspresji MMP-9 wykryto również w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w leukocytach i osoczu pobranym od osób w ostrym okresie tej choroby (Gijbels i wsp. 1992, Leppert i wsp. 1998, 2001). Z kolei podwyższony poziom MMP-9 i MMP-7 miał miejsce w mózgach zwierząt z autoimmunologicznym zapaleniem mózgu (ang. experimental allergic encephalomyelitis, EAE) – zwierzęcym modelem SM (Kieseier i wsp. 1998). Postuluje się, że wzrost aktywności MMP-9 prowadzi do degradacji białek błony podstawnej, zwiększonej przepuszczalności naczyń i przechodzenia komórek zapalnych z krwi do mózgu. W wyniku tego procesu dochodzi między innymi do zniszczenia otaczającej aksony osłonki mielinowej. Metaloproteazy mogą także wpływać na odpowiedź immunologiczną organizmu poprzez przekształcanie prekursorów niektórych cytokin w ich formy aktywne (English i wsp. 2000).

Rola MMPs w przebiegu choroby Alzheimera pozostaje przedmiotem dyskusji. Nadal nie wiadomo, czy obserwowany wzrost aktywności metaloproteaz ma charakter amyloidogenny czy też zapobiega akumulacji amyloidu β (Yong i wsp. 1998).

Istnieje szereg danych wskazujących na aktywację metaloproteaz w chorobach nowotworowych. Według aktualnych hipotez, popartych wynikami badań biochemicznych, proteolityczna przebudowa ECM umożliwia migrację komórek nowotworowych. Ponadto podwyższona aktywność MMPs stymuluje proces angiogenezy w okolicy guza. Podwyższony poziom różnych MMPs (MT-MMP1, MMP-2 i MMP-9), przy znacząco niższej ekspresji inhibitorów tkankowych, obserwowano w wielu rodzajach nowotworów min. w glejaku i rdzeniaku (medulloblastoma) - nowotworach neuroektodermalnych, charakteryzujących się wysoką inwazyjnością (Rooprai i McCormick 1997).

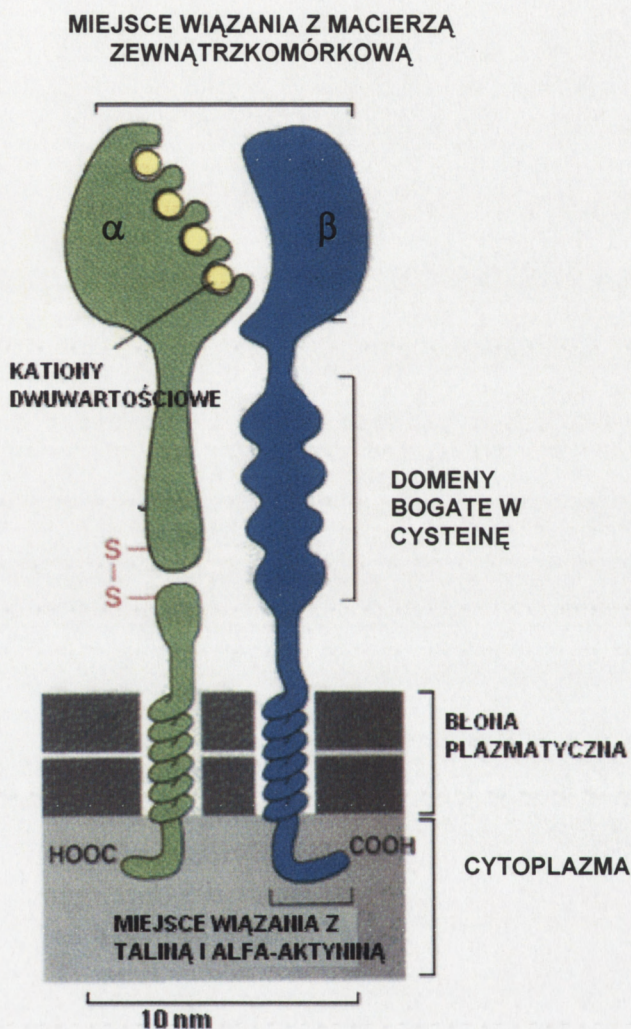
Wzrost aktywności metaloproteaz w mózgu opisano także w niedokrwieniu o charakterze ogniskowym. Co więcej, podwyższone poziomy aktywności metaloproteaz -2 i -9 korelowały z dynamiką śmierci komórek nerwowych. Aktywacja metaloproteaz w tych modelach prowadzi do przzerwiania ciągłości bariery krew-mózg i przenikania do tkanki nerwowej elementów morfotycznych krwi. W autopsyjnym materiale pobranym z mózgow ludzkich podwyższone poziomy MMPs utrzymywały się jeszcze kilka dni a nawet miesięcy po przebytych udarze (Clark i wsp. 1997, Hamann 2003).

Obok przytoczonych wyżej efektów nadmiernej aktywacji metaloproteaz nie mniej istotnym elementem jest degradacja białek ECM. Powstające w wyniku proteolizy fragmenty polipeptydowe mogą utracić zdolność wiązania z właściwymi receptorami integrynowymi. Prawdopodobną konsekwencją tych zdarzeń jest osłabienie lub przerwanie prawidłowego kontaktu komórki z macierzą zewnątrzkomórkową i zahamowanie lub zmiana wewnątrzkomórkowego szlaku przekąźnictwa. Końcowym efektem jest śmierć komórki na drodze apoptozy określanej w tym przypadku „anoikis” (Raff 1992, frisch i Ruoslahti 1997, Gary i Mattson 2001, Lesay i wsp. 2001).

I.2.3. Receptory integrynowe

Funkcja receptorów integrynowych jako przekąźników sygnału z ECM została odkryta na początku lat 90-tych. Uproszczony schemat receptora integrynowego przedstawia Rycina 6. Integryny są heterodimerami złożonymi z dwóch podjednostek będących glikoproteinami (α i β) połączonych wiązaniem niekowalencyjnym. Do chwili obecnej opisano 16 różnych podjednostek α i 8 podjednostek β . W każdej z podjednostek wyróżnić można dużą domenę zewnątrzkomórkową, pojedynczy odcinek transbłonowy i krótką, liczącą około 50 aminokwasów, domenę cytoplazmatyczną.

Podjednostki integrzyn łączą się w różnych układach tworząc 22 rozpoznawalne heterodimery α/β . Podjednostki α na ogół tworzą dimer tylko z jedną specyficzną podjednostką β . Jedyne nieliczne (α_4 i α_6) wiążą się z dwoma podjednostkami β . Wyjątek stanowi podjednostka α_5 , tworząca połączenia z pięcioma podjednostkami β .



Rycina 6. Schemat budowy receptora integrzynowego

Receptory integrynowe rozpoznają przede wszystkim białka macierzy zewnątrzkomórkowej, chociaż niektóre mogą wiązać także ligandy rozpuszczalne (fibrynogen) lub receptory zlokalizowane na komórkach sąsiednich (tzw. counter-receptory). Zgodnie z dotychczasową opinią, za specyficzność wiązania odpowiada podjednostka α . Na końcu aminowym tej podjednostki znajduje się sekwencja aminokwasowa, wiążąca kationy dwuwartościowe (Ca^{2+} lub Mg^{2+}), co jest warunkiem koniecznym dla przyłączenia liganda do integryny. Podejmowane próby klasyfikacji integrzyn na podstawie specyficzności wiązania liganda wykazały dużą zmienność badanych układów. Podczas gdy niektóre integryny wiążą

tylko jeden ligand (np. klasyczny receptor fibronektyny), inne typy integryn współdziałają z kilkoma peptydami. Ponadto niektóre białka macierzy wiążą się z wieloma integrynami. Taki system, aczkolwiek wydaje się paradoksalny, ma z pewnością znaczenie funkcjonalne.

Integryny, w odróżnieniu od receptorów powierzchniowych dla hormonów czy innych molekuł sygnałowych, charakteryzują się niskim powinowactwem wiązania ligandów, natomiast jest ich 10-100 razy więcej. Taka aranżacja umożliwia równoczesne wiązanie dużej liczby molekuł białkowych ECM, umożliwiając komórce utrzymanie szerokiego kontaktu z otaczającym środowiskiem. Natomiast charakter wiązania, jego niskie powinowactwo, umożliwia szybkie zmiany interakcji z macierzą zewnątrzkomórkową, przez co ułatwia migrację komórek.

Dotychczas nie został wyjaśniony w sposób jednoznaczny mechanizm odpowiedzialny za przeniesienie informacji z ECM do komórki. Wiadomo bowiem, że krótkie domeny cytoplazmatyczne podjednostek integryn są pozbawione aktywności enzymatycznych - cech charakterystycznych dla receptora generującego sygnał wewnątrzkomórkowy. Nie posiadają także sekwencji umożliwiających interakcję z białkami G. Częściowe wyjaśnienie tego problemu przyniosło zastosowanie techniki jądrowego rezonansu magnetycznego oraz techniki rezonansowego przeniesienia sygnału emisji fluorescencji (ang. fluorescence resonance energy transfer, FRET). Badania przeprowadzone przy użyciu tych metod potwierdziły wcześniejszą hipotezę, że wiązanie białek ECM do integryn inicjuje zmianę konformacji obu domen podjednostek receptora: zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej (Takagi i wsp. 2002, Kim i wsp. 2003). Procesowi temu towarzyszy fosforylacja zaangażowanej w przekazanie sygnału integrynowego cytoplazmatycznej kinazy tyrozynowej FAK.

1.2.4. Kinaza FAK

Kinazę pp¹²⁵FAK (ang. focal adhesion kinase) opisano po raz pierwszy w roku 1992 jako niereceptorową, białkową kinazę tyrozynową, aktywowaną wiązaniem białek macierzy zewnątrzkomórkowej do receptorów integrynowych. Zaakceptowano również jej kluczową rolę w przekazaniu sygnału z ECM (Hanks i wsp. 1992, Schaller i wsp. 1992).

Kinazę FAK zidentyfikowano u ludzi, myszy, kurczęcia i żaby (*Xenopus*) (Hanks i wsp. 1992, Schaller i wsp. 1992, Whitney i wsp. 1993, Hens i DeSimone 1995). Białko kinazy tych gatunków prezentowało około 90% homologii sekwencyjnej. Kinaza FAK jest produktem pojedynczego genu. Izofорма kinazy, zlokalizowana dotychczas jedynie w ośrodkowym układzie nerwowym i oznaczana symbolem FAK+, jest wynikiem

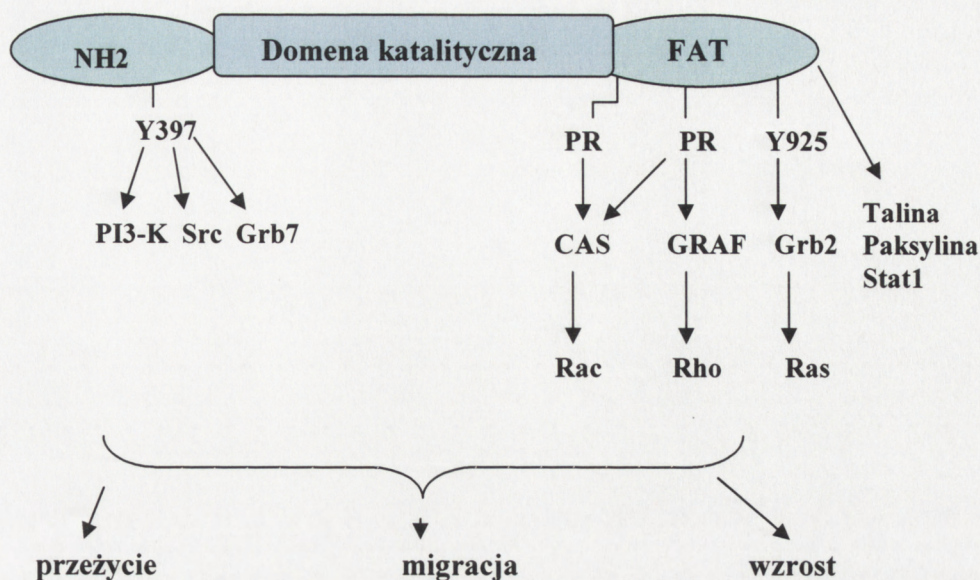
alternatywnego złożenia pierwotnego transkryptu. Izoforma kinazy posiada 3 dodatkowe reszty aminokwasowe prolinę (Pro), tryptofan (Trp) i argininę (Arg) w pobliżu tyrozyny w pozycji 397 łańcucha polipeptydowego (Burgaya i Girault 1996). Funkcja tych aminokwasów nie jest jasno określona. Być może ta forma kinazy jest aktywowana przez specyficzne bodźce komórkowe w odmienny sposób aniżeli forma natywna a obecność dodatkowych aminokwasów może wzmacniać aktywność enzymu.

I.2.4.1. Struktura molekularna kinazy FAK

Kinaza FAK, podobnie jak inne kinazy niereceptorowe, nie posiada domeny zewnątrzkomórkowej. W molekularnej strukturze enzymu można wyróżnić położoną centralnie domenę katalityczną, obudowaną dużymi (liczącymi ok. 400 aminokwasów) domenami bocznymi -N i -C końcową. W wyniku interakcji domeny N-końcowej z domeną katalityczną lub C-końcową enzym utrzymywany jest w stanie nieaktywnym. Przyjęcie aktywnej konformacji zależy od związania końca aminowego kinazy z β integryną. Dotychczas brakuje dowodów wskazujących na bezpośrednią interakcję tych molekuł *in vivo* (Schaller i wsp. 1995). Niektóre badania sugerują, że w tej interakcji pośredniczą białka cytoszkieletowe - talina i paksylina (Turner 2000).

Odcinek C-końcowy białka FAK posiada sekwencje bogate w prolinę. Są to miejsca wiązania białkowych domen SH3. Leżący w obrębie tego odcinka fragment, złożony z około 100 reszt aminokwasowych, nazywany skrótowo FAT (ang. focal adhesion targeting), odpowiada za translokację enzymu do miejsc kontaktu komórki z macierzą (Hildebrand i wsp. 1993). W niektórych typach komórek domeny końca karboksylowego, zwane FRNK (FAK-related non kinase), mogą być ekspresjonowane jako autonomiczne molekuły, regulujące negatywnie aktywność kinazową (Taylor i wsp. 2001).

Unikalna budowa molekularna kinazy FAK umożliwia interakcje enzymu z wieloma białkami - strukturalnymi, adaptorowymi i enzymatycznymi. Białka te mogą aktywować liczne szlaki przekazywania sygnałów, wpływając na podstawowe procesy biologiczne, takie jak wzrost, migracja i różnicowanie komórek (Schwartz 2001) (Ryc.7).



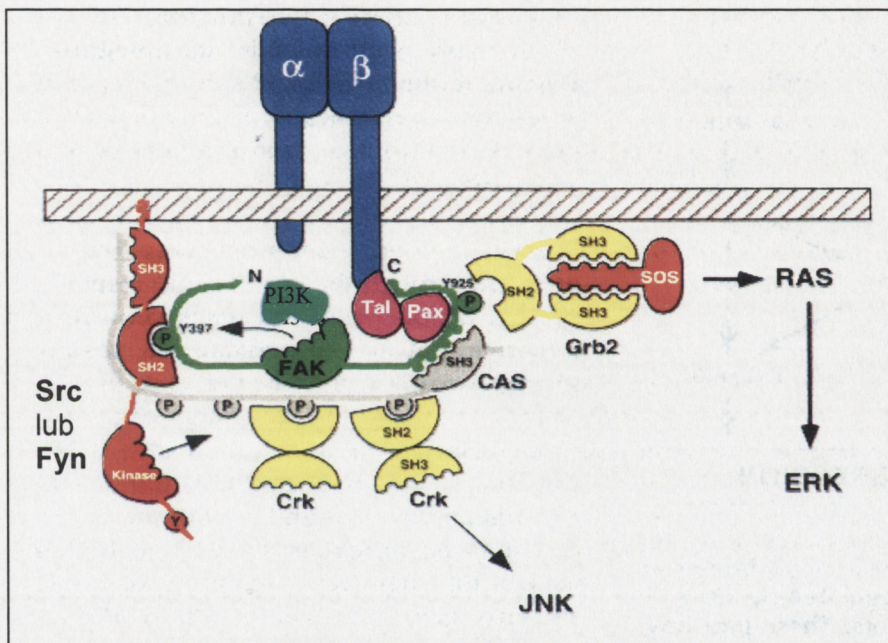
Rycina 7. Asocjacje kinazy FAK z białkami strukturalnymi, adaptorowymi i sygnałowymi [wg. Schwartz (2001), zmodyfikowany]

Ufosforylowana reszta tyrozyny w pozycji 397 domeny N-końcowej wiąże białka posiadające domeny SH-2 (ang. Src homology domain 2). Są to przede wszystkim kinazy należące do rodziny kinaz Src, podjednostka p85 kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI-3K), fosfolipaza C γ (PLC γ) i białko adaptorowe Grb-7 (ang. growth factor receptor bound protein-7) (Chen i wsp. 1996, Han i Guan 1999, Akagi i wsp. 2002). Natomiast fosfotyrozyna w pozycji 925 rozpoznaje białko Grb2 (Schlaepfer i Hunter 1996). Bogate w prolinę sekwencje końca karboksylowego asocjują z domenami SH3 (ang. Src homology domain 3) białka adaptorowego p130 Cas i białka aktywującego GTPazę – GRAF (Petch i wsp. 1995, Harte i wsp. 1996, Taylor i wsp. 1998, 1999). Kolejnym miejscem interakcji jest sekwencja aminokwasowa domeny C-końcowej. Sekwencja ta posiada zdolność wiązania białek cytoszkieletowych – paksyliny, taliny i czynnika transkrypcyjnego STAT1 (Schlaepfer i wsp. 1999).

W łańcuchu polipeptydowym białka FAK znajdują się 4 reszty seryny (Ser-722, Ser-843, Ser-846, Ser-910), które również mogą ulegać ufosforylowaniu. Znaczenie fosforylacji tego aminokwasu nie zostało dotychczas wyjaśnione. Przypuszcza się, że fosfoseryny mogą być zaangażowane w regulację i utrzymanie interakcji kinazy FAK z innymi białkami (Ma i wsp. 2001), jakkolwiek hipoteza ta nie została potwierdzona eksperymentalnie.

I.2.4.2. Drogi sygnałowe z udziałem kinazy FAK

Jak już zaznaczono wcześniej, kluczową rolę w przekazywaniu informacji z ECM pełni tyrozynowa kinaza FAK, aktywowana wiązaniem białek macierzy zewnątrzkomórkowej do receptorów integrynowych. Aktywna, ufosforylowana kinaza przenosi sygnał z ECM na dalsze elementy szlaku przekaźnictwa, wpływając na różne etapy rozwoju komórek (Ryc. 8). Zamieszczony schemat przekazywania sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej z udziałem kinazy FAK został opracowany na podstawie wyników badań *in vitro*, prowadzonych na komórkach nie-neuronalnych.



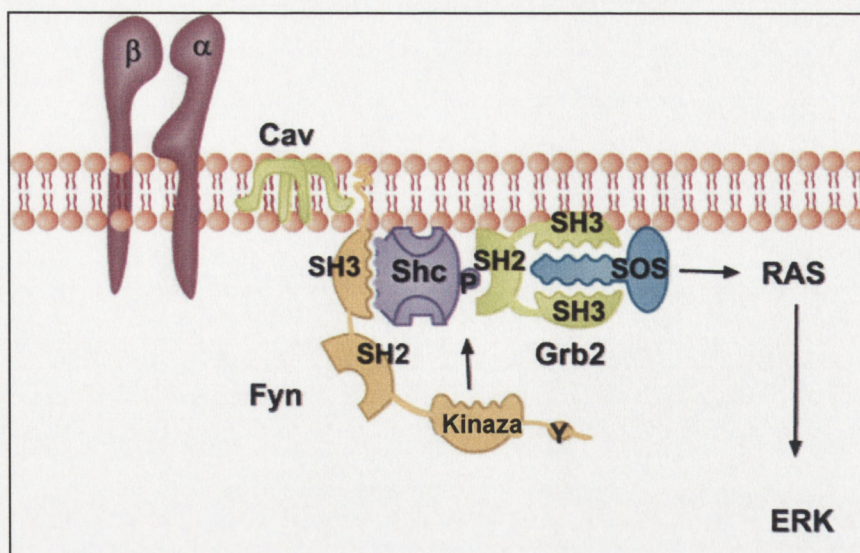
Rycina 8. Schemat przekazywania sygnału z udziałem kinazy FAK (wg. Giancotti i Ruoslahti (1999), zmodyfikowany)

Zgodnie z przedstawioną sekwencją zdarzeń, wiązanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej z receptorami integrynowymi prowadzi do autofosforylacji tyrozyny 397 (Tyr-397, Y397) cząsteczki białka FAK. Zgodnie z aktualnymi poglądami jest to etap kluczowy, determinujący aktywację dalszych szlaków przekaźnictwa. Ufosforylowana tyrozyna 397 jest rozpoznawana przez domenę SH2 kinaz z rodziny Src. Dane eksperymentalne z zastosowaniem inhibitora kinazy Src wskazują, że asocjacja obu kinaz jest warunkiem ich aktywacji (Schlaepfer i wsp. 1994). Aktywna kinaza Src fosforyluje reszty tyrozynowe w obrębie domeny katalitycznej (Tyr 576/577) cząsteczki FAK, co umożliwia osiągnięcie maksymalnej aktywności enzymatycznej (Calalb i wsp. 1995, Owen i wsp. 1999). Natomiast fosforylacja reszty tyrozyny 861 przy udziale kinazy Src wzmacnia prawdopodobnie fosforylację FAK na tyrozynie 397 (Leu i Maa, 2002).

Aktywne kinazy mogą fosforylować białka cytoszkieletowe oraz białka adaptorowe: paksylinę, talinę i p130 Cas. Ufosforylowane białko p130 Cas, oryginalnie zidentyfikowane jako substrat fosforylacji przez onkoproteinę v-Crk, wiąże kinazę Crk. Zgodnie z uzyskanymi danymi eksperymentalnymi, szlak ten prowadzi do aktywacji kinazy JNK (ang. Jun NH2 terminal kinase). Natomiast fosforylacja następnej reszty tyrozyny 925 przez kinazę Src umożliwia wiązanie kompleksu złożonego z białka adaptorowego Grb-2 i czynnika SOS wymieniającego GDP na GTP (ang. GTP-exchange factor). Ten szlak transdukcji sygnału prowadzi do aktywacji kaskady kinaz MAP. Należy podkreślić, że fosforylacja reszt tyrozynowych kinazy FAK jest możliwa jedynie przy zachowaniu integralnego cytoszkieletu aktyny (Lipfert i wsp. 1992, Schleapfer i wsp. 1999).

Według opinii Giancotti i Ruoslahti (1999), obok opisanego wyżej szlaku przekazywania, istnieje alternatywna ścieżka przekazu sygnału z ECM, prawdopodobnie nie wymagająca udziału kinazy FAK. Autorzy sugerują, że niektóre integryny aktywują także należącą do rodziny kinaz Src kinazę Fyn i białko adaptorowe Shc (Ryc. 9). W tym przypadku rolę błonowego białka adaptorowego ma pełnić kaweolina-1, która wiąże podjednostkę integryny z kinazą Fyn. Asocjację integryn z kaweoliną obserwowano w hodowlach komórek pierwotnych (Wary i wsp. 1998). Taka funkcja kaweoliny-1 pozostaje w zgodzie z organizacją wyspecjalizowanych miejsc na błonie plazmatycznej, wzbogaconych w kinazy z rodziny Src.

Wiązanie białek macierzy do receptorów integryn prowadzi do aktywacji kinazy Fyn, której domena SH3 asocjuje z bogatą w prolinę domeną białka Shc. Białko Shc po ufosforylowaniu reszty tyrozyny 317 łączy się z kompleksem Grb2-SOS. Końcowym etapem jest aktywacja kaskady MAPK. Należy jednak mieć na uwadze fakt, że te ścieżki sygnałowe nie zostały dotychczas dokładnie przebadane.



Rycina 9. Schemat przekazywania sygnału z udziałem kinazy Fyn; Cav – kaveolina [wg. Giancotti i Ruoslahti (1999)]

Tym niemniej prawdopodobne jest, że zarówno kinaza FAK jak również kinaza Fyn i białko Shc mają udział w aktywacji kaskady kinaz MAP. Można postulować, że wybór danej ścieżki sygnałowej jest zależny od rodzaju komórek oraz od stopnia adhezji. Zbyt ubogie dane eksperymentalne uniemożliwiają jednak wyciągnięcie jednoznacznych wniosków.

Zgodnie z istniejącymi sugestiami, w niektórych typach komórek ścieżka przekazywania sygnału z udziałem białka Shc jest odpowiedzialna za indukowany adhezją komórek do macierzy początkowy wzrost aktywacji kinazy ERK. Natomiast kinaza FAK, aktywowana znacznie wolniej, miałaby odpowiadać za przedłużenie aktywacji kinazy ERK (Schlaepfer i Hunter 1998). Za hipotezą tą przemawia fakt, że integryny, które nie aktywują białka Shc, są słabymi aktywatorami ERK i proliferacji (Wary i wsp. 1996, Pozzi i wsp. 1998).

Efektem funkcjonalnym aktywacji kaskady kinaz MAP może być ukierunkowanie losu komórek w stronę przeżycia lub śmierci. Generalnie akceptowany jest pogląd, że aktywacja ERK związana jest z przeżyciem komórki, natomiast zmiana interakcji komórka/ECM oraz aktywacja alternatywnej drogi sygnałowej JNK z nadmiernym ufosforylowaniem c-Jun i zmianą funkcji transkrypcyjnej AP1 może w pewnych warunkach stać się sygnałem apoptotycznym. Zdolność integryn do aktywacji kinazy ERK może mieć szczególnie znaczenie w warunkach ograniczonego dostępu czynników wzrostu.

Innym efektywnym szlakiem pro-życiowym, aktywowanym przez kinazę FAK, jest szlak inicjowany przez PI3K i aktywujący kinazę Akt. Istnienie tego szlaku zostało poparte

dowodami eksperymentalnymi. W niektórych typach komórek obserwowano zależne od adhezji i fosforylacji tyrozyny 397 formowanie kompleksu z podjednostką regulatorową p85 PI3K (King i wsp. 1997, Tamura i wsp. 1999, Tan i wsp. 1999).

Należy jednak mieć na uwadze fakt, że drogi sygnałowe aktywowane przez kinazę FAK nie zostały jeszcze precyzyjnie poznane. Postuluje się ich udział w regulacji procesu migracji i progresji cyklu komórkowego. Badania *in vitro* dostarczyły wprawdzie dowodów, wskazujących na włączenie aktywnej kinazy FAK w proces migracji fibroblastów i komórek CHO (ang. chinese hamster ovary), natomiast udział poszczególnych efektorów kinazy zależał od warunków eksperymentalnych (Cary i wsp. 1996, Owen i wsp. 1999, Sieg i wsp. 1999, 2000). Poszczególni badacze podkreślają zarówno rolę ścieżki sygnałowej z udziałem PI3K, jak i kompleksu FAK/p130Cas/Crk oraz białka Grb7 (Schwartz 2001).

II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Przeprowadzone w ostatnich latach badania mechanizmów śmierci neuronów po przebytych stresie niedokrwiennym wskazują na istnienie dodatniej korelacji pomiędzy aktywnością metaloproteaz z grupy żelatynaz, głównie metaloproteazy 2 i metaloproteazy 9, a dynamiką śmierci komórek nerwowych w ischemii ogniskowej. Do chwili obecnej nie opublikowano jednak danych eksperymentalnych, wskazujących na rolę metaloproteaz w zmianach patologicznych wywołanych niedokrwieniem całkowitym mózgu.

Celem podjętych badań była weryfikacja roboczej hipotezy, że w rejonie CA1 hipokampa, w którym występuje opóźniona śmierć neuronów po niedokrwieniu całkowitym, dochodzi do aktywacji metaloproteaz i przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej. W oparciu o badania *in vitro* wskazujące, że zmiana struktury macierzy aktywuje ścieżki sygnałowe prowadzące do śmierci komórek, podjęliśmy również próbę określenia udziału przemodelowania macierzy zewnątrzkomórkowej w modulacji komórkowego przekazywania sygnału z udziałem niereceptorowej kinazy tyrozynowej FAK.

W badaniach zastosowano ogólnie akceptowany model krótkotrwałego, trwającego 5 minut niedokrwienia mózgu myszokoczka mongolskiego, które indukuje wybiórczo uszkodzenie neuronów piramidowych w rejonie CA1 hipokampa.

Realizacja podstawowego celu pracy wymagała wykonania następujących etapów badań:

- określenie aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych – metaloproteazy 2 i metaloproteazy 9
- oznaczenie poziomu lamininy - białka macierzy zewnątrzkomórkowej
- określenie ekspresji i aktywności kinazy FAK
- oznaczenie stopnia interakcji kinazy FAK z białkami leżącymi na szlaku przekazywania - z kinazą Src i białkiem adaptorowym p130 Cas
- określenie poziomu i stopnia fosforylacji kinazy Src oraz białka p130 Cas
- oznaczenia stopnia interakcji kinazy Src z białkiem p130 Cas

w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w różnym czasie po niedokrwieniu.

III. MATERIAŁ I METODY

III.1. Materiał doświadczalny

Wszystkie doświadczenia prowadzone były na dorosłych myszosczkach mongolskich (*Meriones unguiculatus*) obu płci, o masie ciała 60-70 g. Zwierzęta pochodziły z hodowli IMDiK PAN. Zwierzęta hodowano w naturalnym cyklu dobowym, przy swobodnym dostępie do pożywienia i wody. Po zabiegach operacyjnych zwierzęta przetrzymywane były w podobnych warunkach przez okres podany szczegółowo w opisie doświadczeń.

Wybór myszosczka mongolskiego do badań podyktowany był występującą u tego gatunku anomalią budowy tętnic podstawy mózgu, tzn. brakiem tętnic łączących tylnych koła Willisa. W związku z tym eksperymentalne zatrzymanie krążenia krwi w obu tętnicach szyjnych wspólnych u myszosczka mongolskiego prowadzi do całkowitej ischemii przodomózgowia. W modelu tym możliwe jest stosunkowo proste i wybiórcze wywołanie w rejonie CA1 hipokampa opóźnionych zmian poniedokrwiennych.

III.1.1. Model niedokrwienia.

Niedokrwienie mózgu wywoływano przez zaciśnięcie chirurgicznymi klipsami naczyniowymi obu tętnic szyjnych wspólnych. W czasie zabiegu stosowano narkozę halotanową. Zwierzęta oddychały początkowo mieszaniną 2,5% halotanu w O₂/N₂O (30:70, v/v), po czym stężenie halotanu odniżano do 1,5%. Podczas zabiegu utrzymywano stałą temperaturę ciała zwierzęcia (37°C) przez użycie stolika grzewczego. Temperaturę ciała zwierzęcia mierzono *per rectum*. Epizod niedokrwienny trwał 5 minut. Po upływie tego czasu klipsy naczyniowe usuwano. Po zabiegu zwierzęta umieszczano na okres dwóch godzin pod lampą grzewczą. Postępowanie takie zapobiegało hipotermii poischemicznej. Grupę kontrolną stanowiły myszosczki mongolskie poddane całej procedurze zabiegowej, ale bez zaciskania tętnic szyjnych. Zwierzęta uśmiercano przez dekapitację w określonym czasie po przywróceniu krążenia (reperfuzji), po 0,5, 3, 6, 24, 48, 72 godzinach.

III.1.2. Pobieranie materiału do badań

Przedmiotem badań były całe hipokampy lub ich fragmenty oraz skrawki mózgu. Pobrane od zwierząt doświadczalnych mózgi chłodzono w roztworze soli fizjologicznej o temp. 4°C przez okres 2 minut a następnie izolowano hipokampy. Część hipokampów dzielono wzdłuż szczeliny (*fissura*) na fragment grzbietowy, zawierający wrażliwe na niedokrwienie komórki rejonu CA1 i fragment brzuszny, zawierający struktury odporne na uszkodzenie po niedokrwieniu. Wszystkie czynności wykonywano w temperaturze 0-4°C. Wyzolowane struktury mrożono natychmiast na suchym lodzie, a następnie pobraną tkankę przechowywano w temperaturze -80°C do momentu wykonania oznaczeń. Sposoby przygotowania skrawków mózgu zamieszczono w opisie odnośnych metod.

III.2. Oznaczanie aktywności metaloproteaz: MMP-2 i MMP-9

III.2.1. Izolacja MMP-2 i MMP-9

Aktywność metaloproteaz oznaczano po uprzednim wyizolowaniu enzymów metodą chromatografii powinowactwa (ang. affinity chromatography). Całe hipokampy lub ich fragmenty homogenizowano w 10-krotnej objętości (w/v) buforu (50mM TRIS-HCl, pH 7.6), zawierającego 150 mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0.05% Brij 35, 0.02% NaN₃ i 1% Triton X-100. Homogenaty wirowano przy 11300 rpm przez 5 minut w temperaturze 4°C. W uzyskanym nadsączu oznaczano stężenie białka metodą Lowry. Nadsącz w objętości 300µl, zawierający 1000µg białka inkubowano z 50µl sepharozy B związanej z żelatyną (gelatin-Sepharose 4B, Pharmacia Biotech) przez okres 90 minut w 4°C a następnie wirowano przy 4000 rpm przez 5 minut w temperaturze 4°C. Osad, zawierający związane ze złożem metaloproteazy, płukano 2-krotnie w 500µl buforu do homogenizacji, ale bez Tritonu X100. Po każdym płukaniu zawiesinę wirowano (4000 rpm przez 5 minut w 4°C). Po ostatnim wirowaniu osad zawieszano w 50 µl buforu do płukania z dodatkiem 10 % DMSO i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 4°C ciągle mieszając. Po zakończonej inkubacji zawiesinę wirowano ponownie w podanych wyżej warunkach. W pobranym nadsączu określano aktywność MMP-2 i MMP-9.

III.2.2. Badanie aktywności metaloproteaz metodą zymograficzną

III.2.2.1. Oznaczanie aktywności metaloproteaz w ekstraktach hipokampa

Przygotowane ekstrakty hipokampa mieszano z nie redukującym buforem obciążającym (ang. Sample Buffer) 5-krotnie stężonym, zawierającym: 62,5 mM Tris-HCl o pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 0.05% błękit bromofenolowy. Próby o tej samej zawartości

białka nakładano na przygotowany 7,5% żel poliakrylamidowy spolimeryzowany z 0,1% żelatyny. Elektroforezę prowadzono w buforze elektrodowym (25mM TRIS pH 8.3, 192mM glicyna, 0,5% SDS), przy stałym napięciu prądu wynoszącym 100V, w temperaturze 4°C, przez około 3 godziny. Po zakończeniu elektroforezy z żeli usuwano SDS przez płukanie 2 x 20 minut w 2,5 % wodnym roztworze Tritonu X-100 a następnie żele inkubowano w buforze aktywującym o składzie: 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ i 0.02% NaN₃. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Po upływie tego czasu żele barwiono 0.1% błękitem Coomassi (Coomassie Blue R250) w roztworze wodnym zawierającym 40% metanolu i 10% kwasu octowego. Nadmiar barwnika usuwano roztworem 10% metanolu i 7% kwasu octowego. Jasne prążki widoczne na tle ciemno wybarwionego żelu są wyznacznikiem aktywności badanych enzymów. Pozycję poszczególnych MMPs na żelu określano w obecności standardów MMP-2 i MMP-9 (Oncogene). Poziom aktywności proteolitycznej MMP-2 i MMP-9 oznaczano densytometrycznie stosując program komputerowy Gel Expert Program (Nucleotech. Corp.).

III.2.2.2. Oznaczanie aktywności metaloproteaz na skrawkach metodą „sandwich”

Oznaczenia wykonane na skrawkach miały na celu określenie aktywności metaloproteaz w obecności specyficznych inhibitorów tkankowych, czyli tak zwanej aktywności „netto”.

Wypreparowane mózgi natychmiast chłodzono w zimnym roztworze PBS (o składzie 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl; pH 7.5) i cięto na skrawki o grubości 1mm przy użyciu vibrotomu (752M Vibroslice, Campdent Instruments). Skrawki umieszczano na powierzchni 10% żelu poliakrylamidowego zawierającego 0,1% żelatynę. Tak przygotowany „sandwich” inkubowano w buforze 50mM Tris-HCl, pH 7.5, zawierającym 5mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, w temperaturze 37°C. Po 8 godzinach skrawki usuwano, natomiast żele pozostawiono w buforze przez następne 18 godzin. Po upływie tego czasu żele wybarwiano wodnym roztworem 0.1% błękitu Coomassi zawierającym 40% metanolu i 10% kwasu octowego. Nadmiar barwnika usuwano roztworem 10% metanolu i 7% kwasu octowego. W wyniku przeprowadzonej procedury na żelu pozostawał wyraźny odcisk badanego skrawka, na którym widoczne były przejaśnienia niektórych struktur. Przejaśnienia te wskazywały na lokalizację aktywności proteolitycznej.

III.2.2.3. Oznaczenie aktywności metaloproteaz metodą histochemiczną

Wyizolowane mózgi mrożono natychmiast w suchym lodzie i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu analizy. Przed przygotowaniem skrawków mózgi umieszczano w komorze kriostatu na okres 1 godziny (dla zrównoważenia temperatury) i cięto na skrawki o grubości $20\mu\text{m}$. Skrawki nakładano na szkiełka podstawowe i przechowywano w temperaturze -80°C . Bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń skrawki suszono przez 10-15 minut w temperaturze pokojowej a następnie inkubowano w roztworze żelatyny (100 mg/ml) związanej z fluoresceiną (DQTM gelatin from pig skin, fluorescein conjugate, Molecular Probes, USA). Inkubację prowadzono w pozbawionej dostępu światła wilgotnej komorze, w temperaturze 37°C . Czas inkubacji wynosił 3 godziny. W celu wykluczenia niespecyficznego fluorescencji niektóre skrawki inkubowano w roztworze żelatyny, do którego dodawano inhibitor metaloproteaz - fenantrolinę (Sigma). Stężenie końcowe inhibitora w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 1mM.

Po zakończonej inkubacji skrawki płukano w roztworze PBS i utrwalano przez 15 minut świeżo przygotowanym, zimnym roztworem 4% paraformaldehydu w PBS. Po utrwaleniu skrawki płukano 3 x 10 minut w PBS. Po końcowym płukaniu preparaty zatapiano w medium zapobiegającym zanikowi fluorescencji (Fluoromount G, Southern Biotech., UK) i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym.

Preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym firmy Zeiss przy długości fali światła 450-490 nm. Zebrane obrazy poddawano obróbce graficznej w programie AdobePhotoshop, polegającej na dobraniu rozmiaru, ustawieniu odpowiedniej jasności i kontrastu.

III.3. Oznaczanie ekspresji genu kodującego *MMP-9* metodą reakcji odwrotnej transkrypcji i polimeryzacji łańcuchowej (RT-PCR)

III.3.1. Izolacja całkowitego RNA

Z hipokampa mózgu myszokoczka mongolskiego izolowano całkowite RNA używając odczynnika TRIzol (GIBCO BRL). Postępowano zgodnie z protokołem producenta. Hipokampy homogenizowano w 800 μl TRIzolu w homogenizatorze teflon-szkło i inkubowano homogenat przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie do homogenatu dodawano 160 μl chloroformu. Całość energicznie wytrząsano przez 15 sekund i inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Próby wirowano przy $12000 \times g$ przez 15 minut w 4°C . Do fazy wodnej, zawierającej RNA, dodawano 400 μl izopropanolu, inkubowano w

temperaturze pokojowej przez 10 minut delikatnie mieszając, a następnie wirowano przy 12000 x g przez 10 minut w 4°C. Uzyskany osad przemywano 500µl 75% etanolu i wirowano przy 7500 x g przez 5 minut w temperaturze 4°C. Uzyskany osad suszono na powietrzu przez 5-7 minut, po czym rozpuszczano w 30µl sterylnej wody z dodatkiem 1% dietylopirowęglanu (DEPEC). Czystość i stężenie RNA mierzono w spektrofotometrze (Ultraspec 2000, UV/Visible Spectrofotometr, Amersham Pharmacia Biotech). Stężenie RNA mierzone przy długości fali 260 nm obliczano wg wzoru: $OD_{\lambda 260} \times 40$ (według zasady, że OD 1 oznacza w przybliżeniu stężenie 40 µg RNA /ml). Stosunek odczytów gęstości optycznej $OD_{\lambda 260} / OD_{\lambda 280}$ był wykładnikiem stopnia czystości preparatu. Dla RNA otrzymanego przy użyciu odczynnika TRIzol stosunek ten powinien wynosić w przybliżeniu 1,6-2,0.

III.3.2. Synteza cDNA

Pierwszy etap syntezy obejmował reakcję przyłączania starterów do matrycy RNA. Całą procedurę przeprowadzono przy użyciu odczynników firmy GIBCO, zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. W tym celu pobierano 5µg całkowitego RNA, do którego dodawano po 1 µl Oligo-(dT)₁₂₋₁₈ (500ug/ml) i deoksynukleotydów (dNTP). Całość uzupełniano sterylną wodą z dodatkiem 1% DEPEC do objętości 12µl. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 65°C przez okres 5 minut. Po schłodzeniu prób dodawano do każdej z nich 4µl buforu (5x First Standard Buffer), 2µl 0,1M DTT i 1 µl sterylnej wody z dodatkiem 1% DEPEC, a po 2 minutach inkubacji w 37°C 1µl polimerazy SUPERSRIPT. Próby inkubowano 50 minut w temperaturze 37°C a następnie 15 minut w temperaturze 70°C.

III.3.3. Reakcja polimeryzacji łańcuchowej – PCR

Otrzymane cDNA wykorzystano do specyficznego powielania wybranych sekwencji genu cMMP-9 metodą polimeryzacji łańcuchowej (ang. polymerase chain reaction - PCR). Zastosowano startery oligonukleotydowe specyficzne dla MMP-9: (‘5) ‘5-AGTTTGGTGTCGCGGAGCAC-‘3 oraz (‘3) ‘5-AAACCCCACTTCTTGTCAG-‘3 (TIB MOLBIOL Sp. z o.o.) Do 2µl cDNA dodawano kolejno odczynniki: 2,5 µl 10 x stężonego buforu do PCR (o składzie: 750mM Tris-HCl (pH 8,8), 200mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween20), 2 µl 25mM MgCl₂, 1µl dNTP, po 1µl starterów (‘3) i (‘5), 14.5 µl sterylnej wody z dodatkiem 1% DEPEC oraz 1µl *Taq* polimerazy DNA. Przeprowadzano 35 cykli syntezy DNA przy zachowaniu następujących warunków: 1 min. w 93°C, 1 min. w 54°C, 1 min. w 72°C. Korzystano z aparatu PTC-100TM (MJ Research, Inc). Według tej samej procedury powielano także konstytutywnie ekspresjonowany gen *GAPDH*, który był standardem wewnętrznym.

Otrzymane fragmenty DNA rozdzielano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy w buforze elektrodowym TBE (45mM TRIS- kwas borowy pH 8.0, 1mM EDTA). Elektroforezę prowadzono 45 minut przy stałym napięciu prądu (70V). Następnie żele fotografowano w świetle UV. Pomiar gęstości optycznej uzyskanych prążków przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego Gel Expert Program (Nucleotech. Corp.).

III.4. Immunochemiczna analiza poziomu białek – Western Blot

III.4.1. Przygotowanie prób

Całe hipokampy lub ich fragmenty homogenizowano ręcznie w homogenizatorze teflon-szkło w 10-krotnej objętości (w/v) buforu lizującego RIPA (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.1% SDS, 1mM ortovanadian sodu, leupeptyna (5µg/ml), aprotynina (5µg/ml), pepstatyna A (5µg/ml), PMSF (0.1 mg/ml)). Próby inkubowano 45 minut w 4°C (na lodzie), a następnie w tej samej temperaturze wirowano przy 11000 rpm przez 30 minut. W otrzymanych ekstraktach oznaczano stężenie białka (metoda Lowry).

III.4.2. Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE)

Elektroforezę (SDS-PAGE) prowadzono wg metody podanej przez Laemmli (1970). Do przygotowanych lizatów dodawano taką samą objętość dwukrotnie stężonego buforu obciążającego (ang. Sample Buffer) o składzie: 62,5 mM Tris-HCl o pH 6,8; 10% glicerol, 2% SDS, 1,5% β-merkaptanol, 0,05% błękit bromofenolowy. Próbkę umieszczano na 5 minut w łaźni wodnej o temperaturze 100°C. Na każdą ścieżkę żelu nakładano 20-80 µg białka. Stężenie żelu zagęszczającego wynosiło 4%, a rozdzielającego 7,5%, 10% lub 12%, zależnie od ruchliwości elektroforetycznej analizowanego białka. Dla oznaczenia poziomu lamininy rozdział białek prowadzono w żelu gradientowym 4%-20%. Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu prądu wynoszącym 180V przez około 45 minut. Bufor elektrodowy o pH 8,3 zawierał: 25 mM TRIS, 192 mM glicynę oraz 0,5% SDS.

III.4.3. Przenoszenie białek na błonę nitrocelulozową (elektroblotting)

Po zakończeniu rozdziału elektroforetycznego, białka przenoszono z żelu na błonę nitrocelulozową Hybond-Extra C (Amersham) w buforze o składzie: 25 mM Tris-HCl , pH 8.3, 192 mM glicyna, 20% metanol (Towbin i wsp. 1979). Czas przenoszenia przy stałym

napięciu prądu 100V i natężeniu nie przekraczającym 300mA wynosił 90 minut. Efektywność przeniesienia białek sprawdzano poprzez wybarwienie żeli błękitem Coomassie a błon nitrocelulozowych czerwienią Ponceau S (Sigma). Przeniesione na błony nitrocelulozowe białka poddawane były następnie analizie immunochemicznej.

III.4.4. Analiza immunochemiczna

Reakcje ze specyficznymi przeciwciałami prowadzono według protokołów podanych przez producenta.

Do płukania błon i rozcieńczania przeciwciał pierwszorzędowych używano PBS (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄ pH 7.5, 100 mM NaCl) lub TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl) z dodatkiem 0,05% Tween 20 (PBS-T lub TBS-T). TBS-T stosowano w przypadku analizy białek ufosforylowanych. Dla wyeliminowania niespecyficznego wiązania przeciwciał, błony nitrocelulozowe inkubowano przez 1 godzinę w odtłuszczonym 5% mleku rozpuszczonym w PBS-T lub w 5% roztworze albuminy wołowej w TBS-T. Błony inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem, swoistym względem danego antygeny, a następnie z przeciwciałem drugorzędowym. Przeciwciała drugorzędowe rozcieńczano w buforze zawierającym 2% mleko lub 2% albuminę wołową. Nadmiar czynnika blokującego oraz przeciwciał usuwano przez kolejne płukania (3 x 5 minut) w PBS-T lub TBS-T. Dla uwidocznienia reakcji stosowano metodę wzmocnionej chemiluminescencji (ECL), czyli emisji światła towarzyszącej reakcji chemicznej, katalizowanej przez związane przeciwciała drugorzędowe. Korzystano z zestawu firmy Amersham (ECLTM Western blotting detection reagents and analysis system). Immunoreakcję przenoszono na kliszę HyperfilmTM-ECL (Amersham). Natężenie immunoreaktywności, będące wyznacznikiem poziomu badanego białka, określano densytometrycznie w zakresie liniowego przebiegu przy pomocy densytometru firmy LKB (Ultrascan XL) i programu GelScan.

Dla kontroli specyficzności immunoreakcji przeprowadzano identyczną procedurę z pominięciem przeciwciała pierwszorzędowego. Dla wyeliminowania ewentualnych błędów wynikających z niewłaściwej ilości nałożonego na żel białka, oprócz analizy wizualnej błon wybarwionych czerwienią Ponceau, przeprowadzano reakcję immunochemiczną z przeciwciałem skierowanym przeciwko β-aktynie.

Warunki, w których prowadzono reakcje immunochemiczne zostały zamieszczone w poniższej tabeli:

Bufor do płukania	Bufor blokujący	I-rzędowe przeciwciało	Stężenie I-rzędowego przeciwciała	II-rzędowe przeciwciało	Stężenie II-rzędowego przeciwciała
PBS-T	5% mleko w PBS-T, 1 godz.	Poli-klonalne przeciwciało anti-FAK (Santa Cruz Biotechnology)	1:100 w PBS-T, (2 godz.)	Anty-królicze skonjugowane z peroksydazą chrzanową, SIGMA-ALDRICH®	1:8000 w 2% mleku w PBS-T (1 godz.)
TBS-T	5% BSA w TBS-T, 1 godz.	Poli-klonalne przeciwciało anti-FAK pY ³⁹⁷ (Biosource)	1:100 w TBS-T (12 godzin, w temp. 4°C)	Anty-królicze skonjugowane z peroksydazą chrzanową, SIGMA-ALDRICH®	1:8000 w 2% BSA w TBS-T (1 godz.)
TBS-T	5% BSA w TBS-T, 1 godz.	Mono-klonalne przeciwciało anti-fosfotyrozyna clone 4G10 (Upstate Biotechnology)	1:100 w TBS-T (12 godzin, w temp. 4°C)	Anty-mysie skonjugowane z peroksydazą chrzanową, Amersham Biosciences	1:4000 w 2% BSA w TBS-T (1 godz.)
PBS-T	5% mleko w PBS-T, 1 godz.	Mono-klonalne przeciwciało anti-Src (Upstate Biotechnology)	8:1000 w PBS-T (2 godz)	Anty-mysie skonjugowane z peroksydazą chrzanową, Amersham Biosciences	1:4000 w 2% mleku w PBS-T (1 godz.)
PBS-T	5% mleko w PBS-T, 1 godz.	Mono-klonalne przeciwciało anti-p130 Cas (Transduction Laboratories)	1:1000 w PBS-T (2 godz.)	Anty-mysie skonjugowane z peroksydazą chrzanową, Amersham Biosci.	1:4000 w 2% mleku w PBS-T (1 godz.)

PBS-T	5% mleko w PBS-T, 1 godz.	Poli-klonalne przeciwciało anty- β -aktyna (SIGMA-ALDRICH [®])	1:100 w PBS-T (2 godz.)	Anty-królicze skonjugowane z peroksydazą chrzanową, Amersham Biosciences	1:8000 w 2% mleku w PBS-T (1 godz.)
PBS-T	5% mleko w PBS-T, 1 godz.	Poli-klonalne przeciwciało anty-laminina (SIGMA-ALDRICH [®])	1:1000 w PBS-T (2 godz.)	Anty-królicze skonjugowane z peroksydazą chrzanową, SIGMA-ALDRICH [®]	1:8000 w 2% mleku w PBS-T (1 godz.)

III.5. Immunoprecypitacja

Do 500 μ l ekstraktu, zawierającego 1500 mg białka, dodawano 2 μ l przeciwciała specyficznego dla antygeny FAK, p130Cas lub Src. Próbkę inkubowano w temperaturze 4°C przez 3 godziny przy ciągłym mieszaniu (kołyska). Powstałe kompleksy białko-przeciwciało osadzano na złożu proteina A-sefaroza (Proteina A-Sepharose Cl 4B, Pharmacia, USA), dodając 50 μ l złoża zawieszzonego w 0,14 M Na₂HPO₄ (pH 9,3) i inkubując mieszaninę przez 12 godzin w 4°C. Osad otrzymany po wirowaniu przy 4000 rpm przez 5 minut w temperaturze 4°C płukano 3 x 500 μ l 10mM TRIS-HCl (pH 7,5) z dodatkiem 0,9% NaCl. Po ostatnim wirowaniu do osadu dodawano 50 μ l buforu obciążającego (Sample Buffer: 62,5 mM Tris-HCl o pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 1% β -mercaptoetanol, 0.05% błękit bromofenolowy). Próby umieszczano na 5 minut w łaźni wodnej o temperaturze 100°C i po schłodzeniu wirowano przy 4000 rpm przez 5 minut. Białka nadsącza rozdzielano przy pomocy elektroforezy (SDS-PAGE).

III.6. Inne procedury

III.6.1. Oznaczanie stężenia białka metodą Lowry

Oznaczenie polega na pomiarze absorbancji barwnego kompleksu przy długości fali 750 nm. Mieszanina reakcyjna w końcowej objętości 460 μ l zawierała: 2 μ l białka, 8 μ l wody, 50 μ l odczynnika A (BIO-RAD, nr kat. 500-0113) i 400 μ l odczynnika B (BIO-RAD, nr kat. 500-0114). Wartość absorbancji mierzono po 15 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej wobec próby odniesienia (nie zawierającej białka). Standardem był roztwór albuminy wołowej o stężeniu 10 μ g/ μ l lub 15 μ g/ml. Stężenie białka obliczano według następującego wzoru:

Białko całkowite (μ g/ μ l) = absorbancja próbki x stężenie standardu / absorbancję standardu / 2 (objętość białka w próbce)

III.6.2. Analiza statystyczna

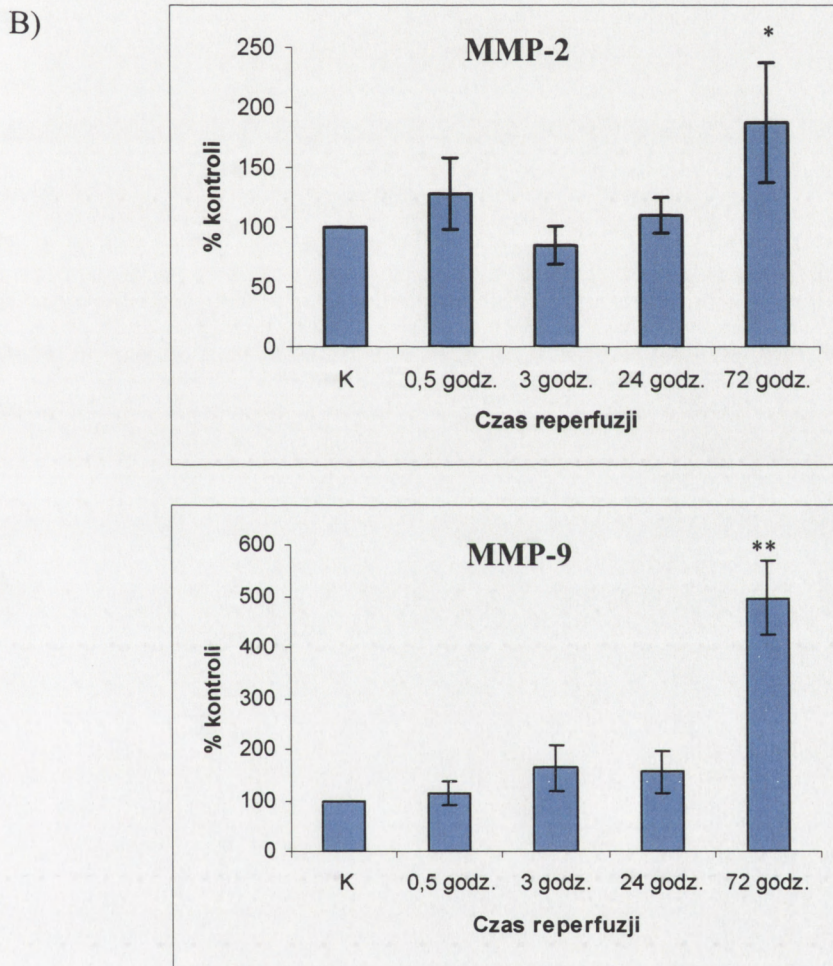
Otrzymane wyniki przedstawiono jako wartości średnie z szeregu doświadczeń, \pm odchylenie standardowe (SD). Ilość powtórzeń zaznaczono w opisie rycin. Różnice między średnimi obliczono za pomocą analizy wariancji ANOVA (post test Dunnett). Do wszystkich obliczeń stosowano program Prism 2.01.

IV. WYNIKI

IV.1. Aktywność MMP-2 i MMP-9 w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji

IV.1.1. Aktywność MMP-2 i MMP-9 oceniana w ekstraktach hipokampa metodą zymografii żelowej

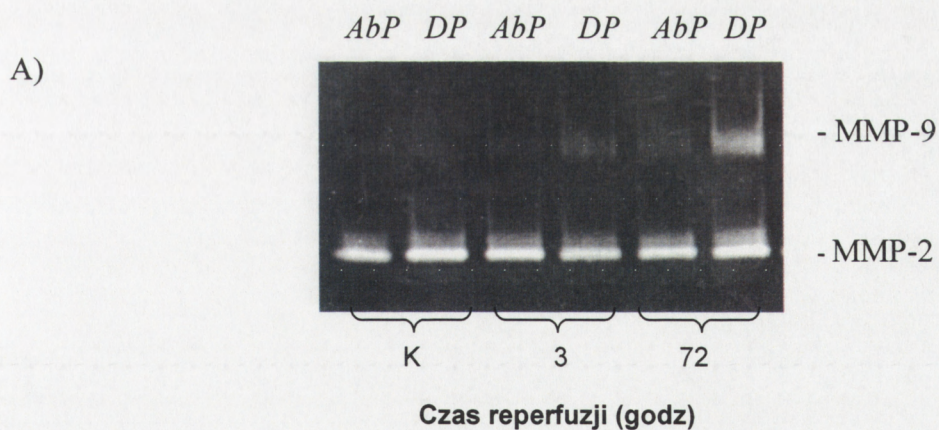
Zymografia żelowa ekstraktów hipokampa wskazuje na obecność dwóch prążków o ruchliwości elektroforetycznej odpowiadającej 92 i 72 kDa (Ryc. 10). Zgodnie ze wzorcem aktywności prezentowanej przez oczyszczone enzymy, prążek odpowiadający 92 kDa jest wyznacznikiem aktywności proteolitycznej metaloproteazy 9 (żelatynazy B), natomiast prążek o ruchliwości 72 kDa wskazuje na aktywność metaloproteazy 2 (żelatynazy A). Inkubacja żeli w obecności EGTA - chelatora jonów wapnia lub fenantroliny - inhibitora metaloproteaz znosiła aktywność obu badanych izoform. Obserwacja ta wskazuje, że proteoliza żelatyny wprowadzonej do żelu poliakrylamidowego jako substrat związana jest z aktywnością metaloproteaz. Krótkotrwałe niedokrwienie przedomózgowia myszokoczka prowadzi do zmian aktywności badanych enzymów po przywróceniu krążenia. Znaczący wzrost aktywności metaloproteazy 2 do 187,2% wartości charakterystycznej dla hipokampa zwierzęcia kontrolnego obserwuje się po upływie 72 godzin. Widoczny na żelu niewielki wzrost aktywności proteolitycznej tego enzymu po 30 minutach od zakończenia epizodu niedokrwienego okazał się być nieistotny statystycznie. Podobny do MMP-2 charakter zmian aktywności po niedokrwieniu prezentuje druga z badanych metaloproteaz - MMP-9. Istotny, około pięciokrotny w porównaniu z kontrolą, wzrost poziomu aktywności tego enzymu ma miejsce jedynie po 72 godzinach reperfuzji. Brak prążka proteolitycznego na wysokości MMP-9 w analizowanym równolegle ekstrakcie kory przedomózgowia sugeruje, że aktywacja tej izoformy w badanym przez nas modelu niedokrwienia jest specyficzna dla hipokampa.



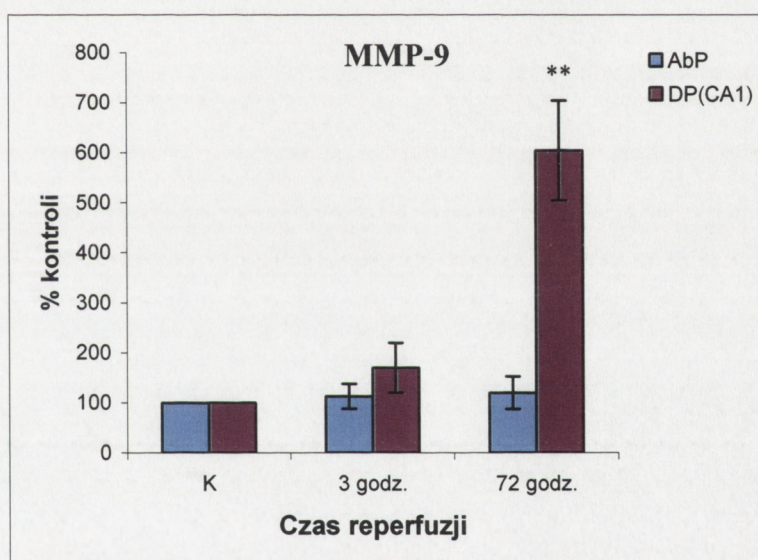
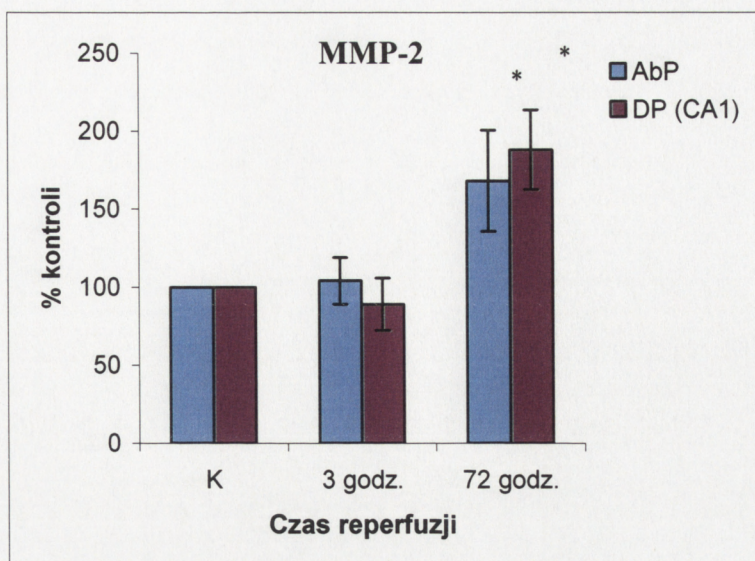
Rycina 10. Aktywność metaloproteaz MMP-2 i MMP-9 w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu A) Reprezentatywny zymogram przedstawia aktywność MMP-2 i MMP-9 w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie (0,5, 3, 24, 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Ostatnia ścieżka na zymogramie (72-kora) ilustruje aktywność MMPs w korze przodomózgowia myszokoczka po 72 godzinach reperfuzji. Na żel spolimeryzowany z żelatyną nakładano po 30 μ l próby przygotowanej przy zastosowaniu chromatografii powinowactwa wg procedury opisanej w rozdziale Materiał i Metody (podrozdziały 2.1. i 2.2.1.). B) Wykresy ilustrują względną aktywność MMP-2 i MMP-9 uzyskane w wyniku ilościowej analizy densytometrycznej. Aktywność metaloproteaz wyrażono w wartościach względnych, w stosunku do przyjętego za 100% poziomu MMPs w hipokampie

zwierzęcia kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt (n=5) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej (K) zostały zaznaczone jako *p<0,05, **p<0,01.

Dla określenia, czy zmiany aktywności badanych metaloproteaz po czasowym niedokrwieniu przodomózgowia dotyczą całego hipokampa, czy też określonej jego struktury, oznaczono aktywność MMPs w dwóch fragmentach hipokampa, różniących się reakcją na epizod niedokrwienności. W tym celu oddzielono wrażliwą na niedokrwienie część grzbietową hipokampa zawierającą sektor CA1 od odpornej na stres ischemiczny części brzusznej (sektor CA2/CA3 i zakręt zębaty). Ekstrakty przygotowane z obu części hipokampa poddano analizie zymograficznej. Wyniki badań wskazują na istotny wzrost aktywności MMP-2 po 72 godzinach reperfuzji w obu badanych strukturach. W części grzbietowej hipokampa aktywność proteolityczna MMP-2 wzrosła do 188%, a w części brzusznej do 168% w porównaniu z poziomem kontrolnym. Odmienny wzór odpowiedzi na niedokrwienie prezentowała metaloproteaza 9. Po 72 godzinach reperfuzji znaczący wzrost aktywności MMP-9 występował jedynie w części grzbietowej hipokampa i przewyższał kilkakrotnie poziom oznaczony we fragmencie brzuszny (Ryc.11).



B)

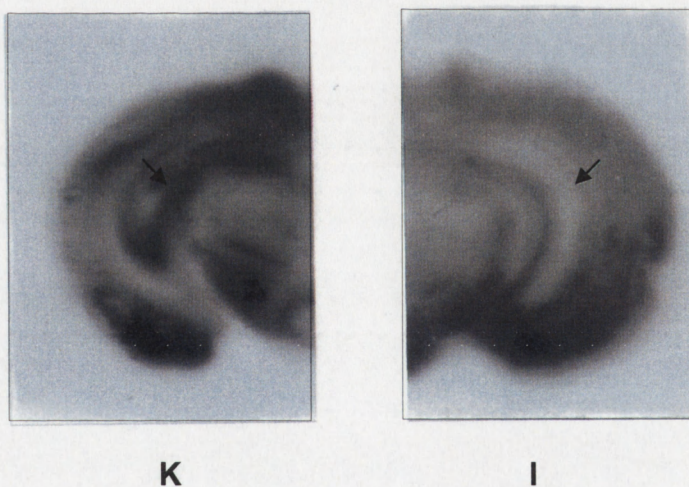


Rycina 11. Aktywność metaloproteaz MMP-2 i MMP-9 w części brzusznej i grzbietowej (sektor CA1) hipokampa mózgu myszkoczka mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu A) Reprezentatywny zymogram żelowy przedstawia zmiany aktywności MMP-2 i MMP-9 we fragmencie brzusznej (*AbP*) i grzbietowej (*DP*) hipokampa mózgu myszkoczka w kontroli i w różnym czasie reperfuzji (3 i 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Na żel spolimeryzowany z żelatyną nakładano po 30µl próby przygotowanej przy zastosowaniu chromatografii powinowactwa wg procedury opisanej w rozdziale Materiał i Metody (podrozdziały 2.1. i 2.2.1.). B) Wykresy ilustrują względne poziomy aktywności MMP-2 i MMP-9, uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej. Aktywność metaloproteaz wyrażono w wartościach względnych w stosunku do przyjętego za 100%, poziomu MMPs w odnośnych fragmentach hipokampa zwierzęcia kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt ($n=5$) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej (K) zostały zaznaczone jako * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

IV.1.2. Aktywność MMP-2 i MMP-9 w skrawkach mózgu oceniana metodą zymografii *in situ*

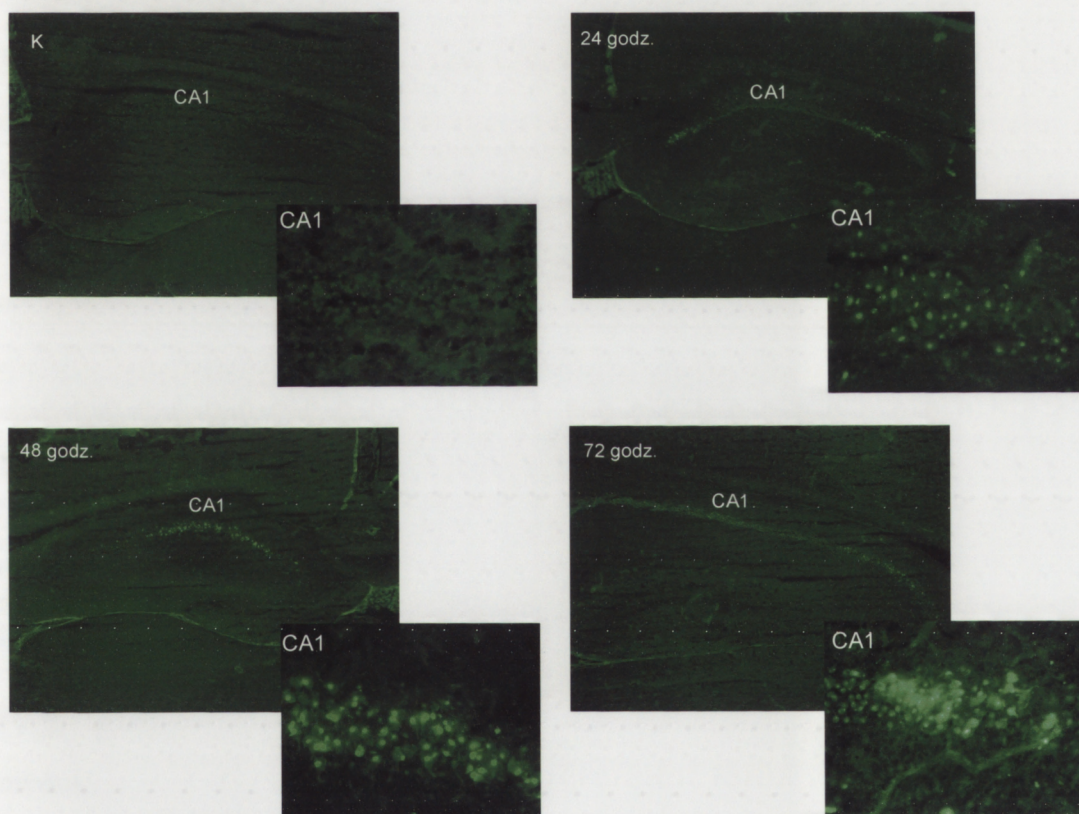
Poprzednie nasze wyniki uzyskane metodą zymografii żelowej wskazują na indukowane epizodem niedokrwiennym zmiany aktywności MMPs, ale nie zawierają informacji o poziomie aktywności endogennej metaloproteaz, prezentowanej w obecności specyficznych inhibitorów tkankowych. W kolejnym etapie badań oznaczano aktywność MMPs *in situ* w przygotowanych skrawkach mózgu, stosując dwie metody: „sandwich” oraz metodę histochemiczną. Ograniczeniem obu metod jest niemożliwość rozróżnienia aktywności związanej z daną izoformą enzymu.

Wyniki badań z zastosowaniem metody „sandwich” wskazują, że po 72 godzinach reperfuzji produkty proteolizy żelatyny, uwidocznione w postaci przejaśnień, obserwuje się głównie w rejonie CA1 hipokampa, przy braku aktywności proteolitycznej w hipokampie mózgu zwierzęcia kontrolnego (Ryc.12).



Rycina 12. Aktywność metaloproteaz (MMP-2 i MMP-9) w mózgu myszokoczka mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu Reprezentatywny zymogram przedstawia aktywność metaloproteaz w mózgu zwierzęcia kontrolnego (K) oraz poddanego czasowemu niedokrwieniu i 72 godzinnej reperfuzji (I). Na żel poliakrylamidowy spolimeryzowany z żelatyną nakładano skrawek mózgu o grubości 1mm i inkubowano w buforze aktywującym metaloproteazy, zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiały i Metody (podrozdział 2.2.2). Po upływie 18 godzin żele barwiono wodnym roztworem zawierającym 40% metanolu, 10% kwasu octowego oraz 0.1% Coomassie Blue R250. Nadmiar barwnika usuwano przez płukanie w roztworze 10% metanolu i 7% kwasu octowego. Strzałkami zaznaczono rejon hipokampa. Widoczne na obrazie jasne przejaśnienia na tle ciemno wybarwionego żelu są wykładnikami aktywności proteolitycznej MMPs. Przedstawiony zymogram jest reprezentatywny dla badań wykonanych z użyciem 3 zwierząt kontrolnych (n=3) oraz 4 zwierząt ischemicznych (n=4).

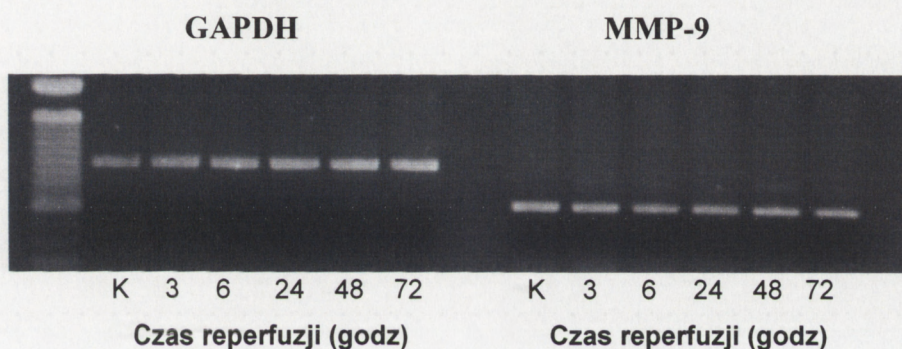
Oznaczenie aktywności metaloproteaz metodą histochemiczną prowadzono w obecności żelatyny związanej z wygaszoną fluoresceiną (FITC), zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 2.2.3). Wykładnikiem aktywności badanych enzymów jest intensywność fluorescencji emitowanej proporcjonalnie do stopnia proteolizy substratu. Uzyskane tą metodą wyniki wskazują na indukcję aktywności metaloproteaz w rejonie CA1 hipokampa mózgu zwierząt poddanych niedokrwieniu i reperfuzji, przy nieznacznej, rozproszonej aktywności MMPs w skrawkach mózgu zwierząt kontrolnych (ryc.13). Wyraźny wzrost fluorescencji notuje się po upływie 24 godzin od epizodu niedokrwiennego, po czym natężenie fluorescencji rośnie równolegle z wydłużaniem czasu reperfuzji do 72 godzin.



Rycina 13. Aktywność metaloproteaz (MMP-2 i MMP-9) w reprezentatywnych skrawkach mózgu myszokoczka mongolskiego w kontroli (K) oraz podczas reperfuzji (24, 48, 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Obrazy ilustrują zmiany aktywności MMPs w całym hipokampie, oraz w sektorze CA1 (wstawka).

IV.2. Ekspresja genu *MMP-9* w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji

Celem badań było sprawdzenie, czy wzrost aktywności *MMP-9* w hipokampie myszokoczka poddanego niedokrwieniu jest wynikiem wzmożonej ekspresji genu kodującego ten enzym. W tym celu oznaczono poziom mRNA. Badanie wykonano przy pomocy reakcji odwrotnej transkrypcji i polimeryzacji łańcuchowej (RT-PCR), z wykorzystaniem starterów oligonukleotydowych specyficznych dla *MMP-9*. Otrzymane wyniki nie wykazały znamiennych statystycznie różnic w ekspresji badanego mRNA pomiędzy grupą zwierząt poddanych niedokrwieniu i reperfuzji a grupą zwierząt kontrolnych (Ryc.14).



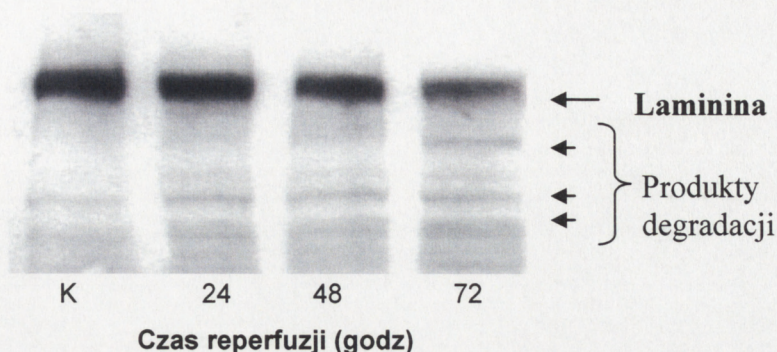
Rycina 14. Ekspresja genu *MMP-9* w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu Reprezentatywny żel agarozowy przedstawiający ekspresję mRNA genu *MMP-9* (prawy panel) i *GAPDH* (lewy panel) w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie reperfuzji (3, 6, 24, 48, 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Reakcję RT-PCR prowadzono zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 3).

IV.3. Poziom lamininy w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji

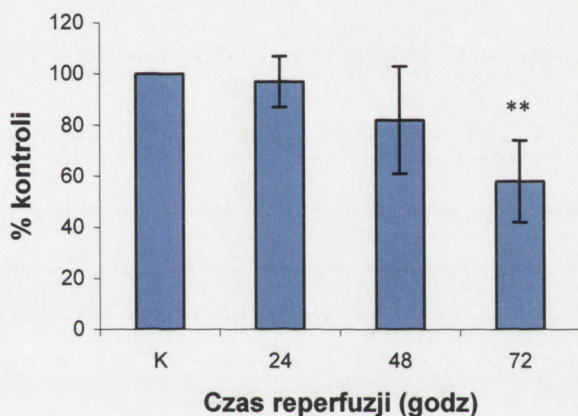
Jednym z sugerowanych mechanizmów molekularnych, odpowiedzialnych za zmianę struktury macierzy zewnątrzkomórkowej, jest jej wzmożona proteoliza, w której kluczową rolę mają pełnić metaloproteazy. Dlatego też w dalszej części badań staraliśmy się określić, czy poniedokrwiennoy wzrost aktywności enzymatycznej proteaz zewnątrzkomórkowych koreluje ze zmianami poziomu jednego z typowych dla tkanki nerwowej białek macierzy – lamininy. Poziom lamininy oceniano metodą immunochemiczną, zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 4). Otrzymane wyniki wskazują, że w czasie reperfuzji po krótkotrwałym niedokrwieniu dochodzi do stopniowego obniżenia

poziomu lamininy z równoczesnym pojawieniem się produktów degradacji. Istotny ubytek białka miał miejsce po 72 godzinach przywróconego krążenia (Ryc.15).

A)



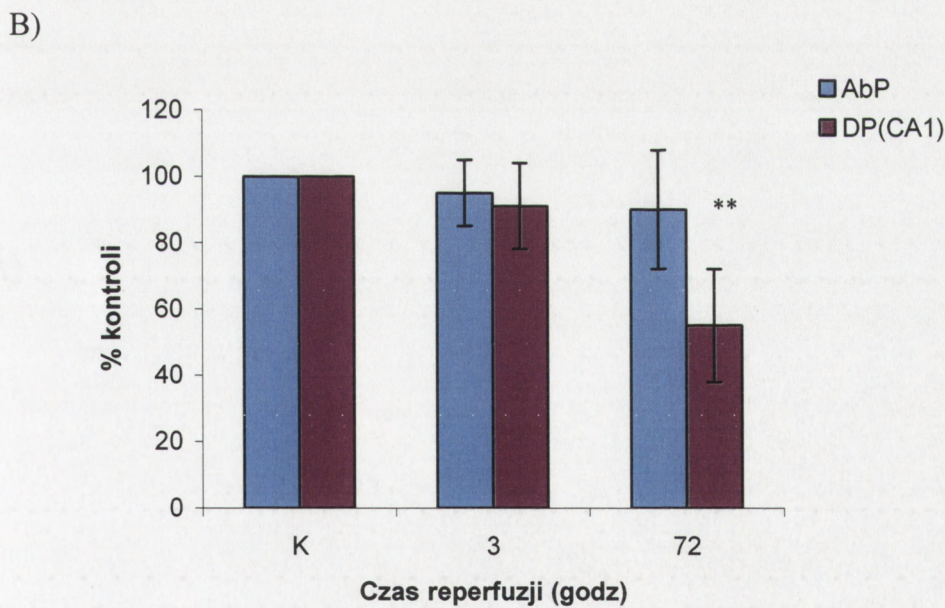
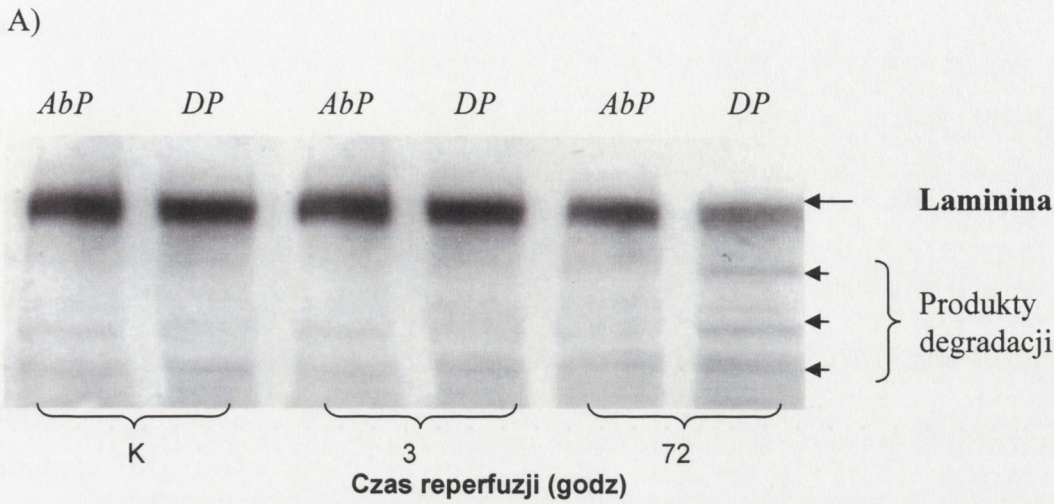
B)



Rycina 15. Ekspresja lamininy w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu A) Reprezentatywny Western Blot przedstawia immunoreaktywność lamininy w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie reperfuzji (24, 48, 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Rozdział elektroforetyczny ekstraktów hipokampa prowadzono w żelu gradientowym (4%-20%), zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 4), nakładając 80µg białka na ścieżkę. Reakcję immunochemiczną wykonano przy użyciu przeciwciała specyficznego dla lamininy. Dla uwidocznienia reakcji stosowano metodę wzmocnionej chemiluminescencji. B) Wykres ilustruje względne poziomy lamininy uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Poziom lamininy wyrażono w wartościach względnych w stosunku do przyjętego za 100% poziomu tego białka w hipokampie zwierzęcia kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt (n=5) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej (K) zostały zaznaczone jako ** $p < 0,01$.

Dla określenia topograficznej lokalizacji proteolizy lamininy w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego oznaczono jej immunoreaktywność w brzusznej i grzbietowej części tej struktury. Oznaczenia wykonano po 3 i 72 godzinach reperfuzji. Otrzymane wyniki wskazują na intensywną degradację lamininy po 72 godzinach reperfuzji,

ograniczoną do części grzbietowej hipokampa, zawierającej rejon CA1. Prezentowane zmiany poziomu lamininy korelują czasowo i przestrzennie z opisaną wyżej aktywacją MMP-9 (Ryc.16)

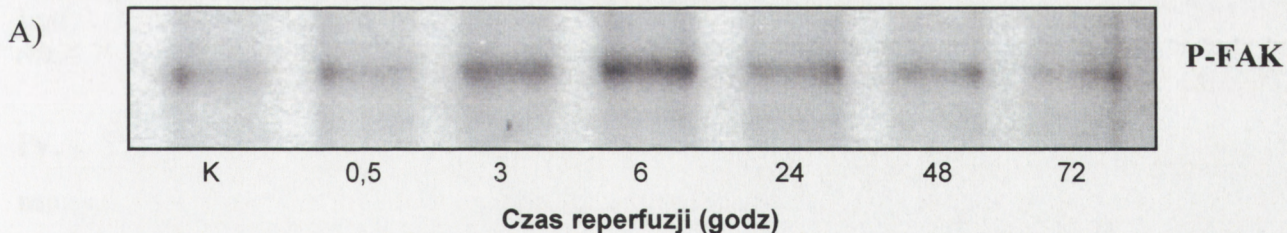


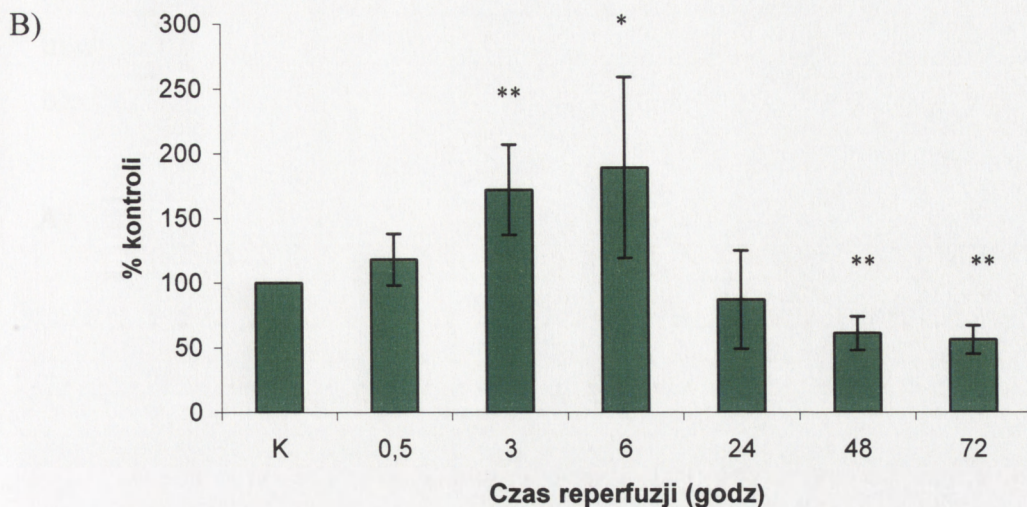
Rycina 16. Ekspresja lamininy w grzbietowym i brzuszonym fragmencie hipokampa mózgu myszokoczka mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu A) Reprezentatywny Western Blot przedstawia immunoraktywność lamininy we fragmencie brzuszonym (*AbP*) i grzbietowym (*DP*) hipokampa mózgu myszokoczka mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie reperfuzji (3 i 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Rozdział elektroforetyczny ekstraktów fragmentów hipokampa prowadzono w żelu gradientowym (4%-20%), zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 4), nakładając 80µg białka na ścieżkę. Reakcję immunochemiczną wykonano przy użyciu przeciwciała specyficznego dla lamininy. Dla uwidocznienia reakcji stosowano metodę wzmacnionej chemiluminescencji. B) Wykres ilustruje względne poziomy lamininy uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Poziom lamininy wyrażono w wartościach względnych w stosunku do przyjętego za 100% poziomu tego białka w hipokampie zwierzęcia

kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt (n=5) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej (K) zostały zaznaczone jako $**p < 0,01$.

IV.4. Poziom fosforylacji tyrozyny kinazy FAK w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji

Poziom fosforylacji FAK określono immunochemicznie stosując przeciwciało specyficzne dla fosfotyrozyny. Prezentowane wyniki badań immunochemicznych wskazują na dwufazowy charakter zmian poziomu fosforylacji FAK w odpowiedzi na czasowe ograniczenie dopływu krwi do mózgu (Ryc. 17). Po znaczącym, dwukrotnym w stosunku do wartości wyjściowych zwiększeniu poziomu ufosforylowanej formy kinazy w czasie pierwszych sześciu godzin po niedokrwieniu, w miarę wydłużania czasu reperfuzji obserwuje się wyraźny spadek specyficznej immunoreaktywności. Po 72 godzinach immunoreaktywność obniżyła się do 50% wartości kontrolnej. Po 24 godzinach reperuzji w hipokampach niektórych zwierząt poziom ufosforylowanej tyrozyny w cząsteczce FAK obniżał się do 60%, u innych utrzymywał się na poziomie 140% w stosunku do kontroli, stąd duże odchylenia standardowe w badanej grupie zwierząt. Fakt ten wynika prawdopodobnie z przesuniętych w czasie odpowiedzi indywidualnych zwierząt na stres niedokrwienno.



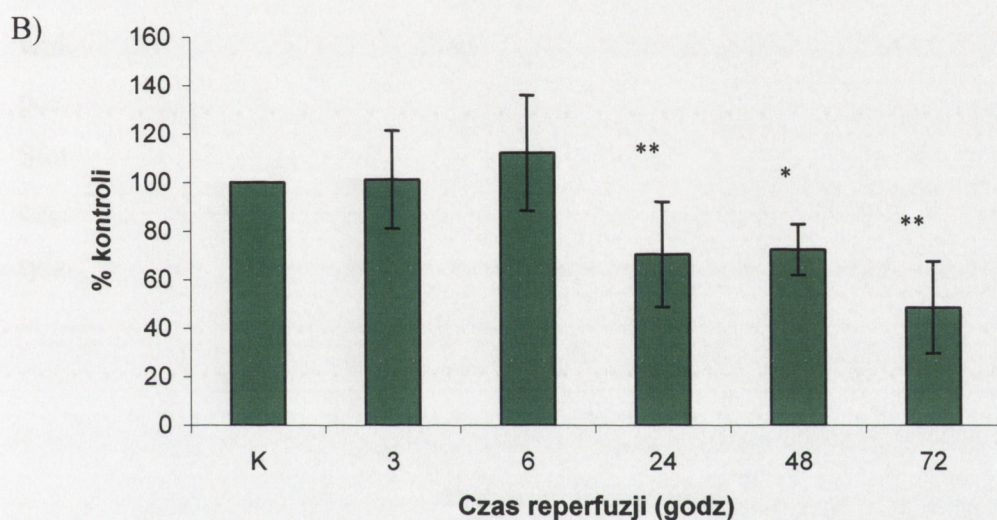
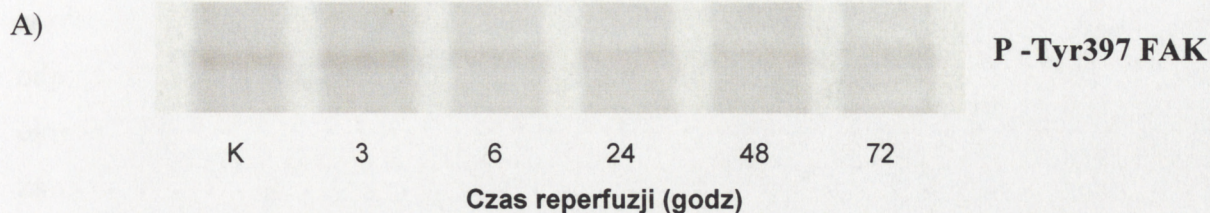


Rycina 17. Poziom fosforylacji tyrozyny kinazy FAK w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu A) Reprezentatywny Western Blot przedstawia immunoreaktywność ufosforylowanej tyrozyny kinazy FAK w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie reperfuzji (0,5, 3, 6, 24, 48, 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Ekstrakty hipokampów o stężeniu białka 1500µg/500µl poddano immunoprecypitacji przy użyciu przeciwciała specyficznego dla białka FAK, zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 5). Immunoprecypitaty poddawano rozdzielni elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym (7,5%). Reakcję immunochemiczną prowadzono z przeciwciałem specyficznym dla fosfotyrozyny i uwidaczniano metodą wzmocnionej chemiluminescencji. B) Wykres ilustruje względne poziomy fosfotyrozyny kinazy FAK uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej wykonanych Western blotów. Poziom fosfotyrozyny wyrażono w wartościach względnych w stosunku do przyjętego za 100% poziomu tego aminokwasu w hipokampie zwierzęcia kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt (n=5) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej (K) zostały zaznaczone jako * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

IV.5. Poziom fosforylacji tyrozyny 397 kinazy FAK w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji

Według ogólnie przyjętego schematu, warunkiem koniecznym dla osiągnięcia pełnej aktywności katalitycznej kinazy FAK jest fosforylacja jej reszty tyrozynowej ulokowanej w pozycji 397 łańcucha polipeptydowego. Dlatego też w dalszej części badań postanowiliśmy sprawdzić, czy obniżenie poziomu całkowitej fosforylacji/aktywacji badanego enzymu w hipokampie mózgu po niedokrwieniu koreluje ze zmianą ufosforylowania tego aminokwasu. Poziom fosfotyrozyny 397 oceniano metodą immunochemiczną. Densytometryczna analiza immunoreaktywności, przedstawiająca względne ilości fosfotyrozyny 397, wskazuje na brak istotnych zmian we wczesnym okresie po niedokrwieniu. Począwszy od 24 godziny reperfuzji notuje się znaczącą redukcję immunoreaktywności aminokwasu, tak że po 72 godzinach poziom fosfotyrozyny 397 spada do 48% wartości kontrolnej (Ryc.18). Obserwowane zmiany korelują czasowo ze spadkiem całkowitej fosforylacji reszt tyrozynowych białka FAK,

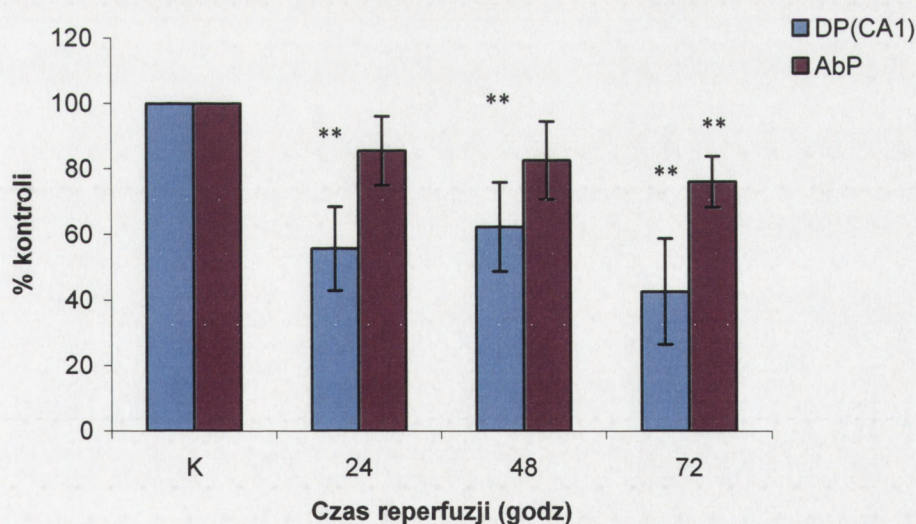
prezentowanej na poprzedniej rycinie. Należy zaznaczyć, że stały poziom immunoreaktywności β -aktyny oznaczanej na blocie wyklucza możliwość popełnienia błędów w czasie preparatyki.



Rycina 18. Poziom fosforylacji tyrozyny 397 kinazy FAK w hipokampie mózgu myszokoczek mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu A) i C) Reprezentatywne Western bloty przedstawiają immunoreaktywność tyrozyny 397 oraz β aktyny w hipokampie mózgu myszokoczek mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie reperfuzji (3, 6, 24, 48, 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Rozdział elektroforetyczny ekstraktów hipokampa prowadzono w 7,5% żelu poliakrylamidowym zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 4), nakładając po 40 μ g białka na ścieżkę. Reakcję immunochemiczną wykonano z przeciwciałem specyficznym dla fosfotyrozyny 397 lub β -aktyny i uwidaczniło metodą wzmacnionej chemiluminescencji. B) Wykres ilustruje względne poziomy fosfotyrozyny 397 uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Poziom fosfotyrozyny wyrażono w wartościach względnych w stosunku do przyjętego za 100% poziomu tego aminokwasu w hipokampie zwierzęcia

kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt (n=5) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej (K) zostały zaznaczone jako *p<0,05, **p<0,01.

W dalszej części badań staraliśmy się wyjaśnić, czy obniżenie aktywności kinazy FAK koreluje topograficznie ze wzrostem aktywności MMP-9 oraz degradacją lamininy, odpowiedziami występującymi wybiórczo w rejonie CA1 hipokampa. W tym celu określiliśmy stopień ufosforylowania Tyr-397 w częściach hipokampa: grzbietowej, zawierającej wrażliwy rejon CA1, oraz brzusznej, odpornej na niedokrwienie. Oznaczenia wykonano po upływie 24, 48 i 72 godzin reperfuzji. Wyniki wskazują na istotne obniżenie immunoreaktywności fosfotyrozyny 397 kinazy FAK w części grzbietowej hipokampa widoczne już po 24 godzinach. Po upływie 72 godzin od momentu przywrócenia krążenia, poziom ufosforylowanej tyrozyny 397 prezentował jedynie 42% wartości kontrolnej. Statystycznie istotny spadek poziomu ufosforylowanej Tyr-397 obserwowaliśmy także w części brzusznej hipokampa. Miał on miejsce jedynie po 72 godzinach reperfuzji i obniżał się tylko o 20% w stosunku do kontroli (Ryc.19).

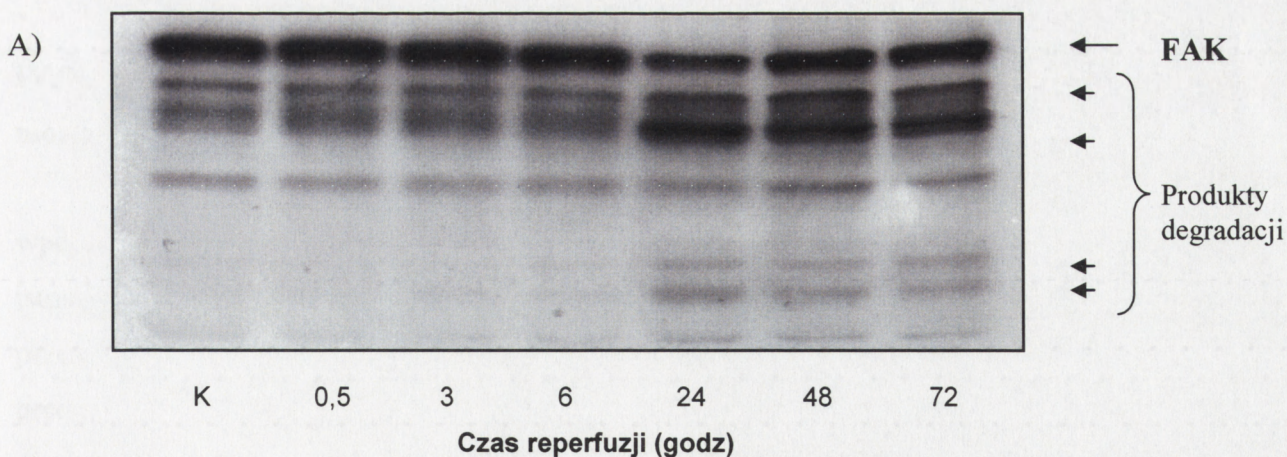


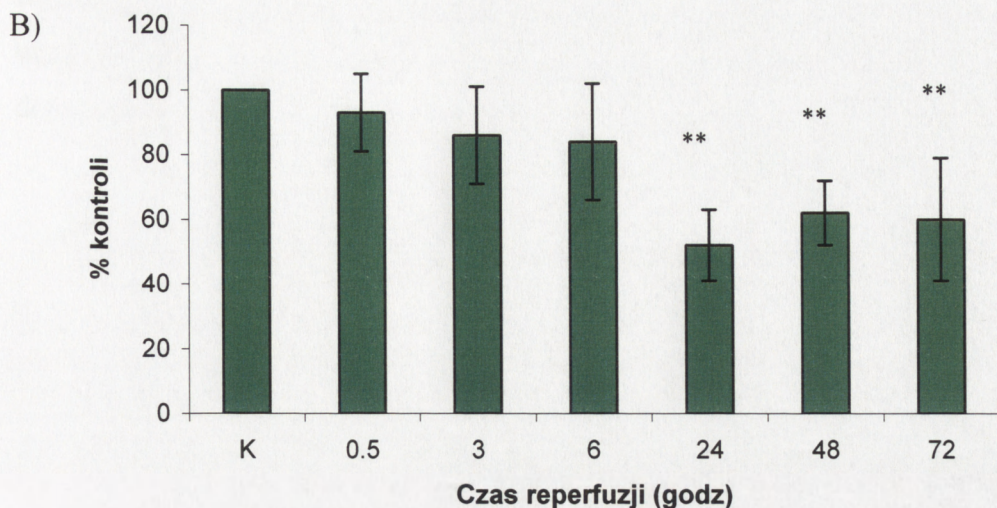
Rycina 19. Poziom fosforylacji tyrozyny 397 kinazy FAK w części brzusznej (AbP) i grzbietowej (DP) hipokampa mózgu myszokoczka mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu
Wykres ilustruje względne poziomy fosfotyrozyny 397 uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów, przedstawiających immunoreaktywność tego aminokwasu w części brzusznej (AbP) i grzbietowej (DP) hipokampa myszokoczka mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie reperfuzji (24, 48, 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Rozdział elektroforetyczny ekstraktów fragmentów hipokampa prowadzono w 7,5% żelu poliakrylamidowym zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 4), nakładając po 40 µg białka na ścieżkę. Reakcję immunochemiczną wykonano z przeciwciałem specyficznym dla fosfotyrozyny 397 i uwidacziano metodą wzmocnionej chemiluminescencji. Poziom fosfotyrozyny wyrażono w wartościach względnych w stosunku do przyjętego za 100% poziomu tego aminokwasu w danej strukturze

hipokampa zwierzęcia kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt (n=5) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej (K) zostały zaznaczone jako **p<0,01.

IV.6. Ekspresja kinazy FAK w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji

Jednym z mechanizmów molekularnych, odpowiedzialnych za obniżenie fosforylacji kinazy FAK w wyniku niedokrwienia, może być wzmożona degradacja białka enzymatycznego. Zatem kolejnym podjętym przez nas zadaniem było sprawdzenie, czy przejściowe niedokrwienie o umiarkowanym stopniu nasilenia obniża poziom białka badanej kinazy. W czasie pierwszych 6 godzin reperfuzji ilość białka kinazy FAK prezentuje wartości zbliżone do wyjściowych. Do znaczącego obniżenia ekspresji białka FAK w hipokampie, do 48,7% wartości kontrolnej, dochodziło po 24 godzinach reperfuzji. Zredukowany poziom białka utrzymywał się po 48 i 72 godzinach reperfuzji, wynosząc odpowiednio 60,8% oraz 58,9% wartości kontrolnej. Zmniejszeniu poziomowi białka kinazy towarzyszyło pojawienie się immunoreaktywnych prążków o ruchliwości elektroforetycznej wynoszącej około 90 kDa, będących najprawdopodobniej produktami rozpadu proteolitycznego. Po dłuższym czasie ekspozycji widoczne stawały się jeszcze dwa dodatkowe prążki, ulokowane na poziomie odpowiadającym 30 i 40 kDa (Ryc. 20).



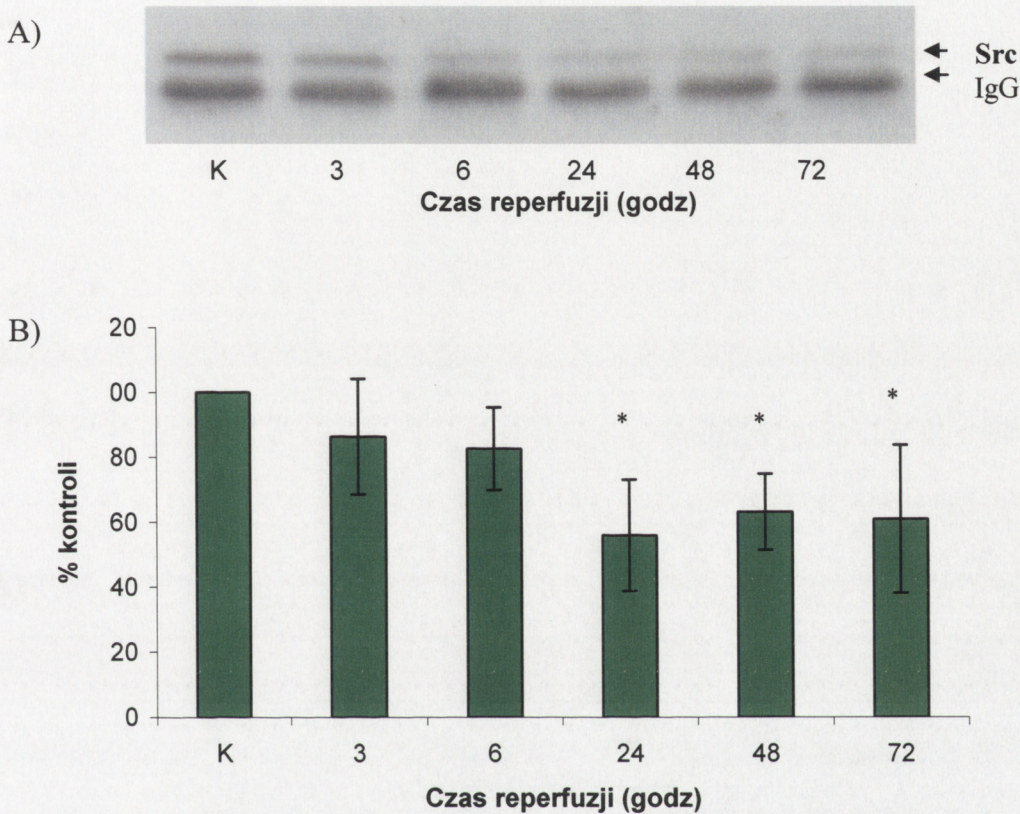


Rycina 20. Ekspresja kinazy FAK w hipokampie mózgu myszkoczka mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu A) Reprezentatywny Western blot przedstawia poziom ekspresji kinazy FAK w hipokampie mózgu myszkoczka mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie reperfuzji (0.5, 3, 6, 24, 48, 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Rozdział elektroforetyczny ekstraktów hipokampa prowadzono w 7,5% żelu poliakrylamidowym, zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 4), nakładając po 40 μ g białka na ścieżkę. Reakcję immunochemiczną wykonano z przeciwciałem specyficznym dla natywnej formy kinazy FAK i uwidaczniano metodą wzmocnionej chemiluminescencji. B) Wykres ilustruje względny poziom kinazy FAK uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Poziom kinazy FAK wyrażono w wartościach względnych w stosunku do przyjętego za 100% poziomu tego białka w hipokampie zwierzęcia kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt ($n=5$) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej (K) zostały zaznaczone jako $**p<0,01$.

IV.7. Asocjacja kinazy FAK z kinazą Src w hipokampie mózgu myszkoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji

Celem tego etapu badań było sprawdzenie czy obniżenie fosforylacji tyrozyny 397 ma wpływ na efektywność powstawania kompleksu kinazy FAK z kinazą Src. Zgodnie z istniejącymi poglądami jest to etap konieczny dla aktywacji wewnątrzkomórkowego przekazywania. Dla realizacji tego zadania oznaczono immunoreaktywność kinazy Src ko-precypitowanej z kinazą FAK. Ekstrakty hipokampów zwierząt kontrolnych i poddanych niedokrwieniu poddano immunoprecypitacji z wykorzystaniem przeciwciała specyficznego dla kinazy FAK. W przygotowanych immunoprecypitatach oznaczono poziom białka kinazy Src przy pomocy metody Western blot, stosując przeciwciała specyficzne dla Src. Wydajność immunoprecypitacji sprawdzano immunochemicznie stosując przeciwciała anty-FAK. We wczesnych okresach reperfuzji (3 i 6 godzin) widoczna jest jedynie tendencja do osłabienia zdolności wzajemnego wiązania obu kinaz. Istotna redukcja kompleksu FAK/Src, wyrażona zmniejszeniem ilości kinazy Src ko-precypitowanej z kinazą FAK, miała miejsce przy

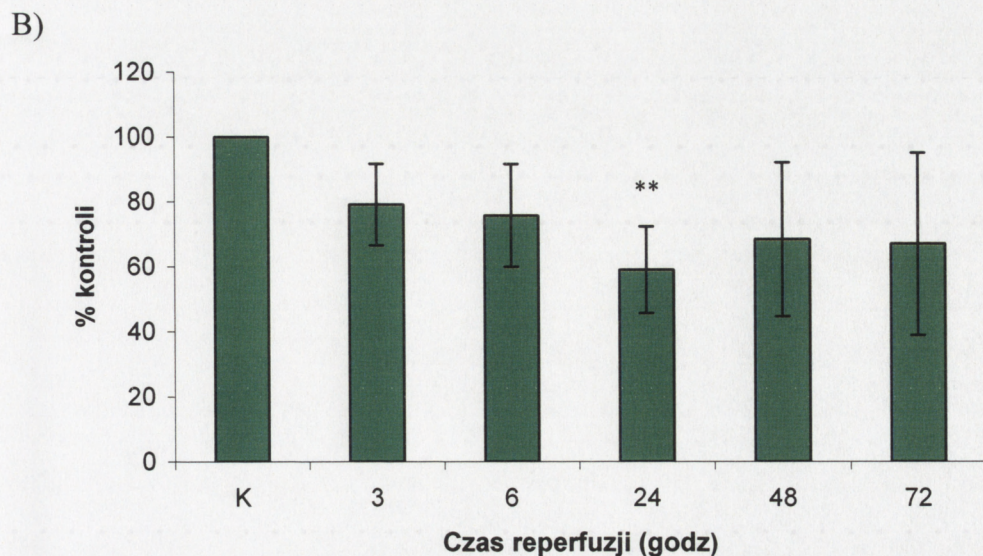
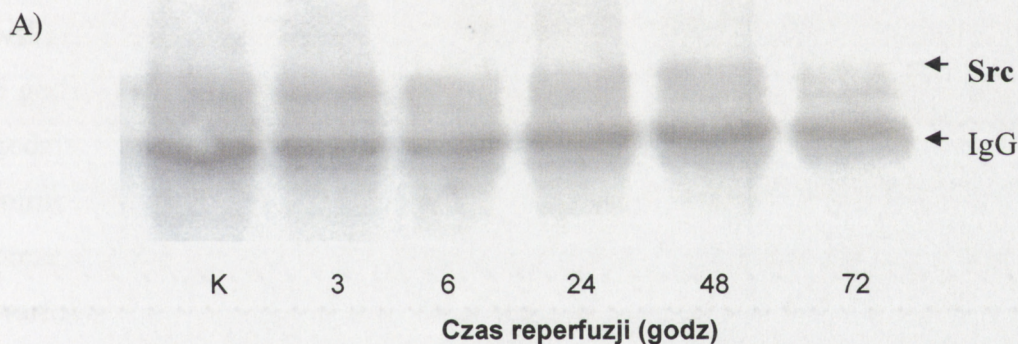
wydłużeniu czasu reperfuzy. Po 24 godzinach immunoreaktywność Src wynosiła około 60% wartości kontrolnych. Taki obniżony poziom kompleksu FAK/Src utrzymywał się do końca doświadczenia (Ryc.21).



Rycina 21. Poziom kinazy Src ko-precypitowanej z kinazą FAK w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego podczas reperfuzy po niedokrwieniu A) Reprezentatywny Western Blot przedstawiający immunoreaktywność kinazy Src ko-precypitowanej z kinazą FAK w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie reperfuzy (3, 6, 24, 48, 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Ekstrakty hipokampów, o stężeniu białka 1500µg/500µl, poddawno immunoprecypitacji z przeciwciałem specyficznym dla kinazy FAK, zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 5). Rozdział elektroforetyczny immunoprecypitatów prowadzono w żelu poliakrylamidowym (7,5%). Reakcję immunochemiczną wykonano z przeciwciałem anti-Src i uwidaczniaro metodą wzmocnionej chemiluminescencji. B) Wykres ilustruje względne poziomy immunoreaktywności kinazy Src ko-precypitowanej z kinazą FAK, uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Poziom kinazy Src wyrażono w wartościach względnych w stosunku do przyjętego za 100% poziomu tego białka w hipokampie zwierzęcia kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt (n=5) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej (K) zostały zaznaczone jako * $p < 0,05$.

IV.8. Poziom fosforylacji tyrozyny kinazy Src w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji

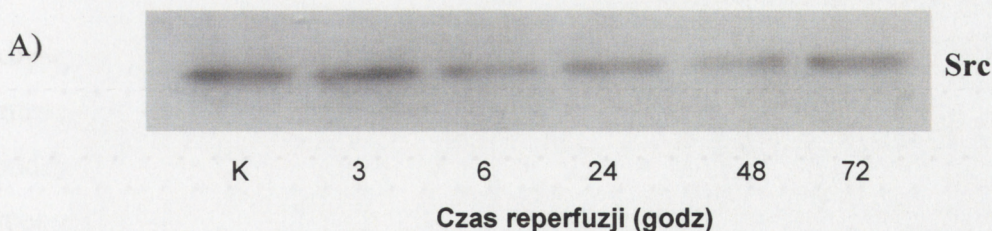
Opisane wyżej wyniki sugerują, że poniedokrwienne obniżenie wiązania kinazy Src z kinazą FAK może prowadzić do zmian aktywności enzymatycznej obu kinaz. Dlatego też w dalszej części badań staraliśmy się określić stopień fosforylacji kinazy Src, będący wykładnikiem aktywności enzymu. W tym celu z ekstraktów badanych hipokampów immunoprecypitowano białko z przeciwciałem specyficznym dla Src. W przygotowanych immunoprecypitatach oznaczano ilość ufosforylowanej kinazy metodą immunochemiczną, wykorzystując przeciwciało specyficzne dla fosfotyrozyny. Znaczące obniżenie poziomu fosfotyrozyny do 60% wartości kontrolnej widoczne jest jedynie po upływie 24 godzin od zakończenia epizodu ischemicznego. Po następnej dobie reperfuzji obserwuje się powrót stopnia ufosforylowania Src do poziomu wyjściowego (Ryc. 13).



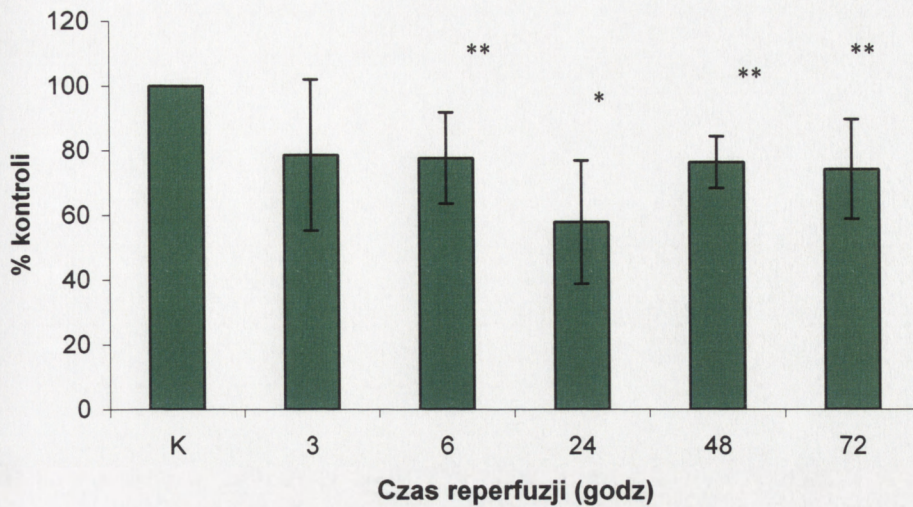
Rycina 22. Poziom fosfotyrozyny kinazy Src w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu A) Reprezentatywny Western Blot przedstawia immunoreaktywność ufosforylowanej tyrozyny kinazy Src w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie reperfuzji (3, 6, 24, 48, 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Ekstrakty hipokampów o stężeniu białka 1500 μ g/500 μ l poddano immunoprecypitacji przy użyciu przeciwciała specyficznego dla białka Src, zgodnie z opisem w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 5). Immunoprecypitaty poddano następnie rozdzielowi elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym (10%). Reakcję immunochemiczną prowadzono z przeciwciałem specyficznym dla fosfotyrozyny i uwidaczniano metodą wzmocnionej chemiluminescencji. B) Wykres ilustruje względne poziomy fosfotyrozyny kinazy Src uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej wykonanych Western blotów. Poziom fosfotyrozyny wyrażono w wartościach względnych w stosunku do przyjętego za 100% poziomu tego aminokwasu w hipokampie zwierzęcia kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt (n=5) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej (K) zostały zaznaczone jako $**p < 0,01$.

IV.9. Ekspresja kinazy Src w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji

W ekstraktach hipokampów oznaczono metodą immunochemiczną poziom kinazy Src. Reakcję prowadzono z przeciwciałem specyficznym dla białka kinazy Src. Uzyskane wyniki wskazują na istotne, w odniesieniu do kontroli, obniżenie immunoreaktywności białka już po 6 godzinach reperfuzji. Redukcja poziomu kinazy Src pogłębiała się w ciągu następnych 18 godzin do 57,8% wartości kontrolnej. Wciąż istotny, choć nie tak dramatyczny spadek immunoreaktywności Src utrzymywał się do momentu zakończenia doświadczenia, prezentując po 48 i 72 godzinach reperfuzji immunoreaktywność na poziomie 76 i 74% wartości wyjściowej (Ryc.23).



B)

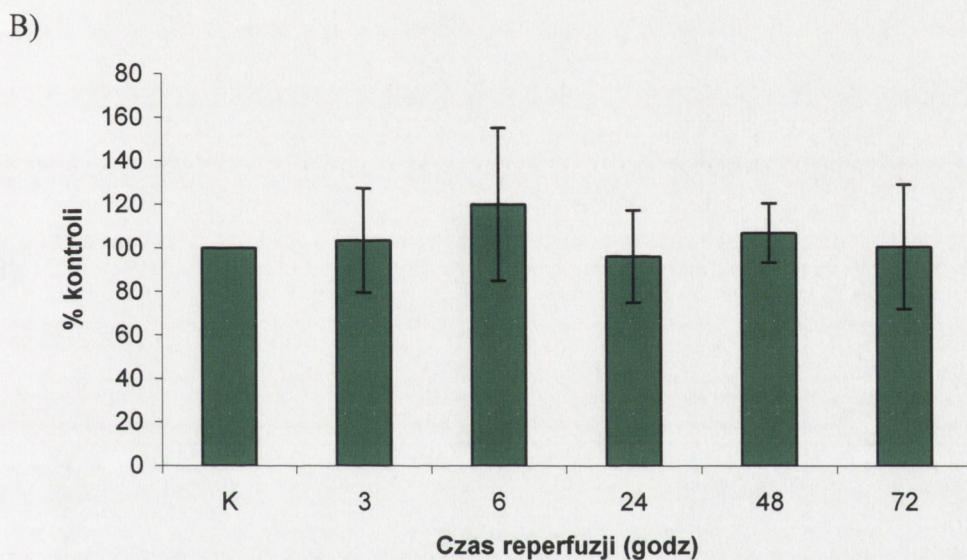
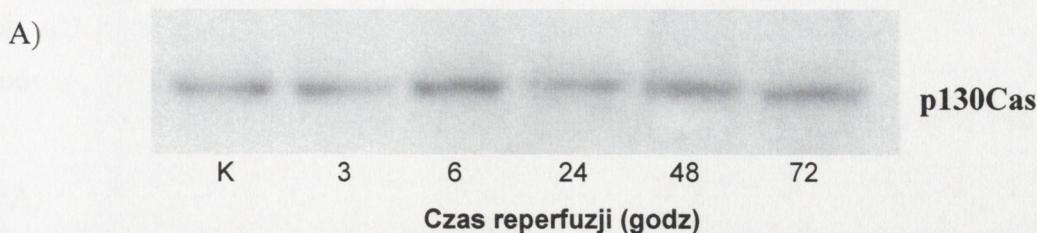


Rycina 23. Ekspresja kinazy Src w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego podczas reperfuzy po niedokrwieniu A) Reprezentatywny Western blot przedstawia poziom ekspresji kinazy Src w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie reperfuzy (3, 6, 24, 48, 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Rozdział elektroforetyczny ekstraktów hipokampów prowadzono w 10% żelu poliakrylamidowym, zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 4) nakładając po 40 μ g białka na ścieżkę. Reakcję immunochemiczną wykonano z przeciwciałem specyficznym dla kinazy Src i uwidaczniano metodą wzmacnionej chemiluminescencji. B) Wykres ilustruje względny poziom kinazy Src uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Poziom kinazy Src wyrażono w wartościach względnych w stosunku do przyjętego za 100% poziomu tego białka w hipokampie zwierzęcia kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt ($n=5$) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej (K) zostały zaznaczone jako * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

IV.10. Asocjacja kinazy FAK z białkiem adaptorowym p130 Cas w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzy

Celem tej części badań było sprawdzenie, czy opisane wyżej obniżenie aktywności kinazy FAK w hipokampie myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu wpływa na jej interakcję z białkiem adaptorowym p130 Cas. Ekstrakty hipokampów zwierząt kontrolnych i poddanych niedokrwieniu poddano immunoprecypitacji z wykorzystaniem przeciwciała specyficznego dla kinazy FAK. W przygotowanych immunoprecypitatach oznaczono poziom białka p130 Cas przy pomocy metody immunochemicznej, stosując specyficzne przeciwciało anti-p130 Cas. Analiza densytometryczna wykonanych Western blotów nie wykazała istotnych zmian poziomu kompleksu FAK/p130Cas, co świadczy o stałej ilości białka Cas ko-precypitowanego z kinazą FAK. Należy zaznaczyć, że wartości uzyskane z analizy poszczególnych zwierząt w obrębie danych grup eksperymentalnych charakteryzowały się dużą zmiennością. Może ona wynikać z niskiej stabilności badanego

kompleksu w naszych warunkach eksperymentalnych lub też może być spowodowana różnicami odpowiedzi indywidualnych zwierząt na niedokrwienie (Ryc.24).

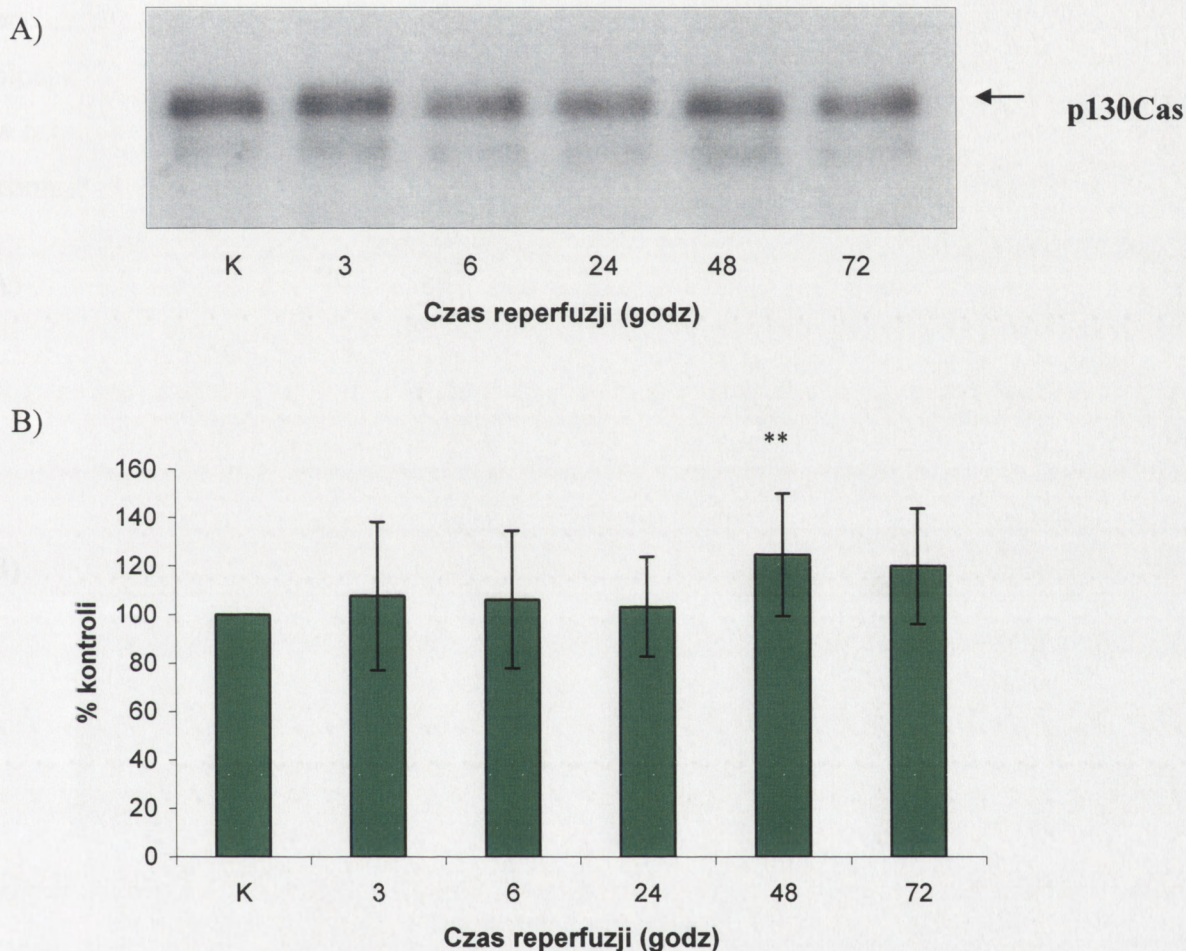


Rycina 24. Poziom białka p130 Cas ko-precypitowanego z kinazą FAK w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu A) Reprezentatywny Western blot przedstawiający immunoreaktywność białka p130 Cas ko-precypitowanego z kinazą FAK w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie reperfuzji (3, 6, 24, 48, 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Ekstrakty hipokampów o stężeniu białka 1500 μ g/500 μ l poddawno immunoprecypitacji z przeciwciałem specyficznym dla kinazy FAK zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 5). Rozdział elektroforetyczny immunoprecypitatów prowadzono w żelu poliakrylamidowym (7,5%). Reakcję immunochemiczną wykonano z przeciwciałem anti-p130Cas i uwidaczniło metodą wzmocnionej chemiluminescencji. B) Wykres ilustruje względne poziomy immunoreaktywności białka p130Cas ko-precypitowanego z kinazą FAK, uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Poziom białka Cas wyrażono w wartościach względnych w stosunku do przyjętego za 100% poziomu tego białka w hipokampie zwierzęcia kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt (n=5) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia.

IV.11. Ekspresja białka adaptorowego p130 Cas w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji

Poziom białka p130 Cas w hipokampach zwierząt kontrolnych i po niedokrwieniu przodomózgowia badano metodą immunochemiczną, wykorzystując specyficzne dla tego

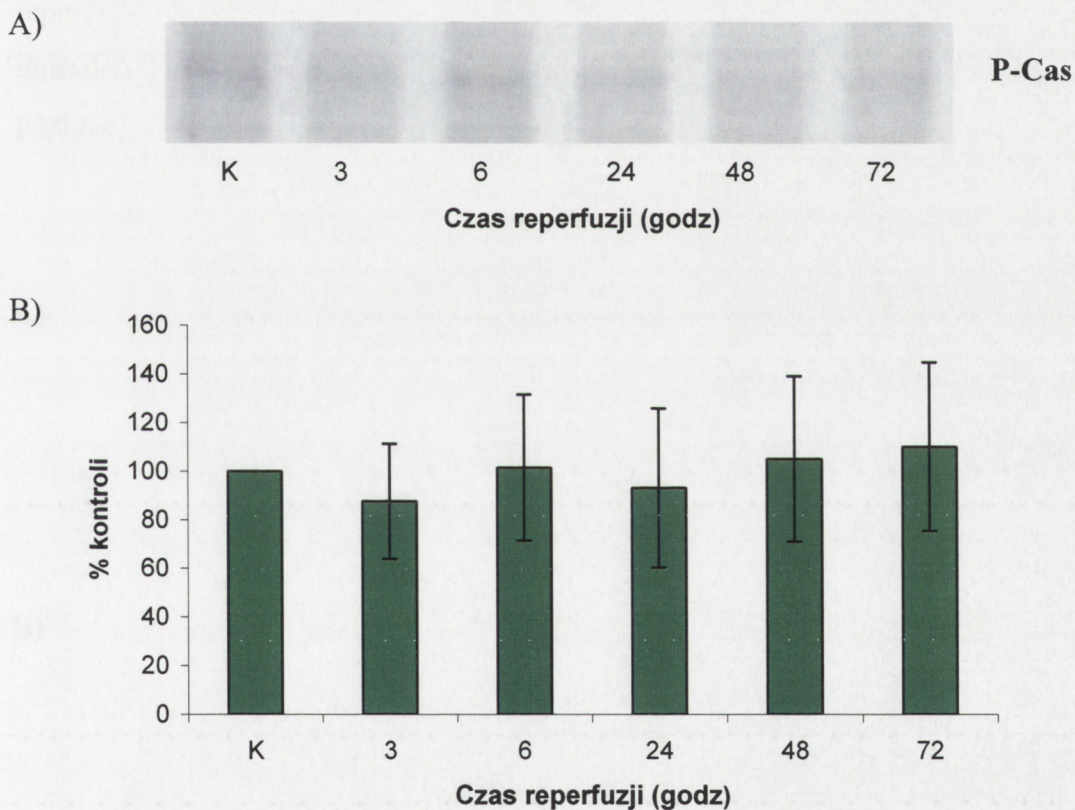
białka przeciwciała. Analiza densytometryczna wykonanych blotów wykazała istotny statystycznie wzrost immunoreaktywności p130 Cas do 124% wartości wyjściowej po 48 godzinach od momentu przywrócenia krążenia. W pozostałych grupach doświadczalnych nie obserwowano istotnych w stosunku do kontroli zmian poziomu białka p130 Cas. Można mówić jedynie o słabej tendencji wzrostowej po 72 godzinach reperfuzji (Ryc.25).



Rycina 25. Ekspresja białka p130 Cas w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu A) Reprezentatywny Western blot przedstawia poziom ekspresji białka p130 Cas w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie reperfuzji (3, 6, 24, 48, 72 godziny) po 5-ciu minutach niedokrwienia. Rozdział elektroforetyczny ekstraktów hipokampów prowadzono w 10% żelu poliakrylamidowym zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 4), nakładając po 40 µg białka na ścieżkę. Reakcję immunochemiczną wykonano z przeciwciałem specyficznym dla białka Cas i uwidaczniano metodą wzmocnionej chemiluminescencji. B) Wykres ilustruje względne poziomy białka p130 Cas uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Poziom białka p130 Cas wyrażono w wartościach względnych w stosunku do przyjętego za 100% poziomu tego białka w hipokampie zwierzęcia kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt (n=5) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej (K) zostały zaznaczone jako **p<0,01.

IV.12. Poziom fosforylacji tyrozyny białka adaptorowego p130 Cas w hipokampie mózgu myszkoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji

Celem tego etapu badań była ocena wpływu niedokrwienia na fosforylację tyrozyny białka p130 Cas. Z ekstraktów badanych hipokampów immunoprecypitowano białko z przeciwciałem specyficznym dla p130 Cas. W przygotowanych immunoprecypitatach oznaczano ilość ufosforylowanego białka metodą immunochemiczną, wykorzystując przeciwciało specyficzne dla fosfotyrozyny. Analiza densytometryczna wykonanych Western blotów nie wykazała istotnych statystycznie zmian stopnia ufosforylowania białka p130 Cas w hipokampach zwierząt poddanych niedokrwieniu przedomózgowia, w stosunku do wartości kontrolnych (ryc.26).

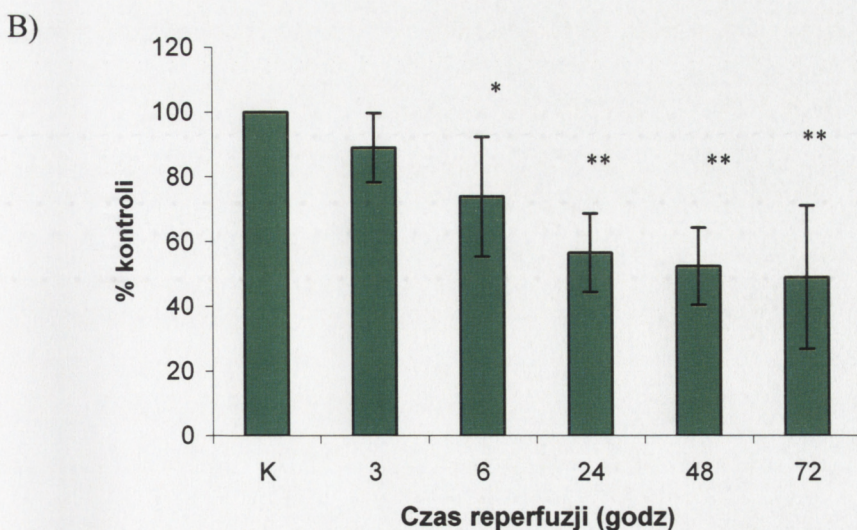
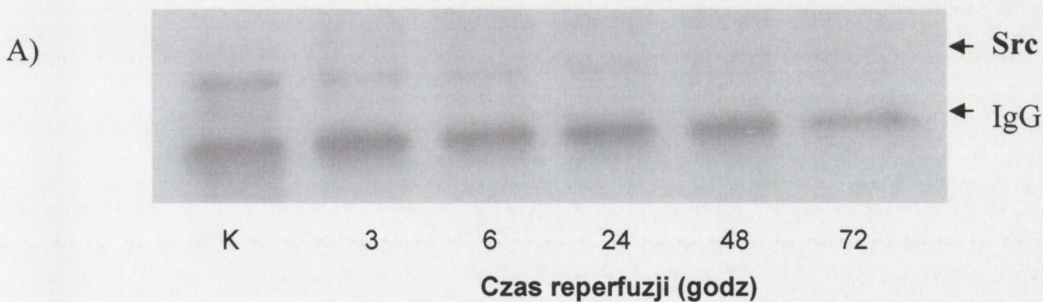


Rycina 26. Poziom fosfotyrozyny białka p130 Cas w hipokampie mózgu myszkoczka mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu A) Reprezentatywny Western Blot przedstawia immunoreaktywność ufosforylowanej tyrozyny białka p130 Cas w hipokampie mózgu myszkoczka mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie reperfuzji (3, 6, 24, 48, 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Ekstrakty hipokampów o stężeniu białka 1500 μ g/500 μ l poddano immunoprecypitacji przy użyciu przeciwciała specyficznego dla białka Cas, zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 5). Immunoprecypitaty poddawano rozdzielni elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym (7,5%). Reakcję immunochemiczną prowadzono z przeciwciałem specyficznym dla fosfotyrozyny i uwidaczniano metodą wzmocnionej chemiluminescencji. B) Wykres ilustruje względne poziomy fosfotyrozyny białka p130 Cas uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej wykonanych Western blotów. Poziom fosfotyrozyny wyrażono w wartościach względnych w stosunku do przyjętego za 100% poziomu tego aminokwasu w hipokampie zwierzęcia

kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt (n=5) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia.

IV.13. Asocjacja białka adaptorowego p130 Cas z kinazą Src w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu i reperfuzji

W tym etapie badań sprawdziliśmy, czy w przebiegu reperfuzji po krótkotrwałym niedokrwieniu przedomózgowia dochodzi do zmian stopnia asocjacji p130 Cas z kinazą Src w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego. Asocjację (ko-precypitację) kinazy Src z białkiem p130 Cas określano metodą immunochemiczną stosując przeciwciało anti-Src, po uprzedniej immunoprecypitacji ekstraktów hipokampa przeciwciałem specyficznym dla białka p130 Cas. Otrzymane wyniki wskazują na istotne, równoległe do czasu trwania reperfuzji, stopniowe obniżanie ilości kompleksu Src/p130Cas. Po 72 godzinach immunoreaktywność kinazy Src ko-precypitowanej z białkiem p130 Cas prezentowała poziom równy 48% wartości wyjściowej (Ryc.27).



Rycina 27. Poziom kinazy Src ko-precypitowanej z białkiem adaptorowym p130 Cas w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego podczas reperfuzji po niedokrwieniu

A) Reprezentatywny Western Blot przedstawiający immunoreaktywność kinazy Src ko-precypitowanej z białkiem p130 Cas w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w kontroli (K) i w różnym czasie reperfuzji (3, 6, 24, 48, 72 godziny) po 5 minutach niedokrwienia. Ekstrakty hipokampów o stężeniu białka 1500 μ g/500 μ l poddawno immunoprecypitacji z przeciwciałem specyficznym dla białka Cas, zgodnie z opisem podanym w rozdziale Materiał i Metody (podrozdział 5). Rozdział elektroforetyczny immunoprecypitatów prowadzono w żelu poliakrylamidowym (7,5%). Reakcję immunochemiczną wykonano z przeciwciałem anti-Src i uwidaczniło metodą wzmocnionej chemiluminescencji. B) Wykres ilustruje względne poziomy immunoreaktywności kinazy Src ko-precypitowanej z białkiem p130 Cas, uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Poziom kinazy Src wyrażono w wartościach względnych w stosunku do przyjętego za 100% poziomu tego białka w hipokampie zwierzęcia kontrolnego. Każda wartość jest średnią arytmetyczną ($\bar{x} \pm SD$), uzyskaną w wyniku analizy 5 zwierząt (n=5) przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Znamienne statystycznie różnice w stosunku do grupy kontrolnej (K) zostały zaznaczone jako *p<0,05, **p<0,01.

V. DYSKUSJA

Istnieje pełna zgodność, że opóźniona śmierć komórek nerwowych po krótkotrwałym, całkowitym niedokrwieniu przodomózgowia jest wynikiem wielu złożonych procesów patobiologicznych i reakcji wtórnych, które wpływają bezpośrednio lub pośrednio na rozwój uszkodzenia. Ostateczny efekt ich oddziaływania na komórkę nie jest w pełni zdeterminowany i zależy od współgrania z całą gamą indukowanych równolegle reakcji. Poszukiwania mechanizmów molekularnych, odpowiedzialnych za śmierć komórek nerwowych w odpowiedzi na zatrzymanie dopływu krwi do mózgu, kierowały się głównie ku wewnątrzkomórkowym procesom i szlakom metabolicznym o powszechnie uznanym działaniu neurotoksycznym, takich jak wzrost stężenia wapnia w komórkach, stres oksydacyjny, działanie tlenu azotu, dysfunkcja mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego czy zaburzenia metabolizmu makromolekuł.

Zgromadzone w ostatnich latach dane eksperymentalne wskazują, że obok wewnątrzkomórkowych mechanizmów poniedokrwiennego uszkodzenia neuronów równie ważne wydają się być zmiany środowiska zewnątrzkomórkowego, niosące za sobą zaburzenie homeostazy interakcji komórki z otaczającą ją macierzą zewnątrzkomórkową. Zdziwienie budzi fakt, że temat ten stał się przedmiotem zainteresowania badaczy dopiero w ostatnim dziesięcioleciu, kiedy to na podstawie wyników badań *in vitro* stwierdzono, że osłabienie lub utrata prawidłowego kontaktu komórki z macierzą zewnątrzkomórkową prowadzi do śmierci komórki na drodze apoptozy określanej terminem anoikis (Raff 1992, Frisch i Ruoslahti 1997, Gary i Mattson 2001, Lesay i wsp. 2001).

Kluczowym momentem było odkrycie, że jednym z głównych mechanizmów, odpowiedzialnych za zmianę przekaźnictwa sygnałów zlokalizowanych po obu stronach błony komórkowej, jest degradacja białek macierzy przy udziale zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych. Jednym z pierwszych dowodów eksperymentalnych, świadczących o krytycznej roli tych enzymów w uszkodzeniu komórek nerwowych hipokampa, był opisany przez Tsirka i wsp. (1997) wzrost aktywności tkankowego aktywatora plazminogenu w modelu ekscytotoksyczności. Nieco później uwaga licznej grupy badaczy skupiła się na zewnątrzkomórkowych metaloproteazach, głównie na metaloproteazie

2 (MMP-2) i metaloproteazie 9 (MMP-9), uznając je za kluczowe enzymy, odpowiedzialne za przemodelowanie struktury macierzy zewnątrzkomórkowej w mózgu (Rosenberg 1995, Clark i wsp. 1997). Dotychczasowe prace eksperymentalne prowadzone w układach *in vivo* i *in vitro* dostarczyły dowodów, że nadmierna stymulacja aktywności tych metaloproteaz może stać się przyczyną śmierci komórek nerwowych w wielu ostrych i przewlekłych stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego (Pagenstecher i wsp. 1998; Yong i wsp. 1998). Wzrost ekspresji i aktywności obu wymienionych izoform zaobserwowano u zwierząt eksperymentalnych poddanych niedokrwieniu o charakterze ogniskowym. Na tej podstawie autorzy prac sugerują, że enzymy te są odpowiedzialne za degenerację neuronów w okolicy otaczającej ognisko ischemiczne (Fujimura i wsp. 1999, Gasche i wsp. 1999, Heo i wsp. 1999, Planas i wsp. 2001).

Wyniki prezentowane w mojej pracy doktorskiej wskazują na wzrost aktywności metaloproteaz -2 i -9 w eksperymentalnym modelu niedokrwienia przedomózgowia myszokoczka mongolskiego. Ograniczona do rejonu CA1 hipokampa aktywacja badanych enzymów po przywróceniu krążenia mózgowego potwierdza słuszność postawionej przez nas hipotezy, że metaloproteazy te mogą stanowić istotny element poischemicznych zmian degeneracyjnych w hipokampie mózgu, charakteryzujących się opóźnieniem występowania i wybiórczością do neuronów piramidowych sektora CA1. W zgodzie z uzyskanymi przez nas wynikami pozostają opublikowane nieco później badania prowadzone na modelu całkowitej ischemii mózgu indukowanej u myszy i szczurów (Rivera i wsp. 2002, Lee i wsp. 2004).

Porównanie wzorców zmian aktywności metaloproteaz przy użyciu metody zymografii żelowej, umożliwiającej rozróżnienie obu badanych enzymów, wskazuje na dominującą rolę metaloproteazy 9. Wyraźne podwyższenie aktywności katalitycznej MMP-9 po 72 godzinach reperfuzji jedynie w sektorze CA1 koreluje z rozpoczynającym się procesem obumierania neuronów w tej strukturze. Silnym argumentem, przemawiającym za kluczową rolą metaloproteazy 9 w ewolucji zmian indukowanych niedokrwieniem, jest opisana w ostatnich latach skuteczność blokowania jej aktywności proteolitycznej oraz znaczące zmniejszenie stanu zapalnego, spowodowane zahamowaniem degradacji białek bariery krew-mózg u myszy pozbawionych genu kodującego tę formę enzymu (Wang i wsp. 2000, Asahi i wsp. 2001b, Lee i wsp. 2004).

W przeciwieństwie do obserwowanej w toku naszych badań ograniczonej do rejonu CA1 odpowiedzi MMP-9, poischemiczny wzrost aktywności metaloproteazy 2 występował w obu badanych strukturach hipokampa - zarówno w rejonie CA1 jak i w opornej na niedokrwienie części brzusznej. Brak selektywnej aktywacji MMP-2 wydaje się być ważną,

aczkolwiek nieoczekiwaną obserwacją, poddającą w wątpliwość przyczynowy udział tego enzymu w opóźnionej degeneracji neuronów hipokampa po krótkotrwałym stresie niedokrwiennym. Za słusnością tej hipotezy przemawiają wyniki badań wskazujące, że usunięcie genu kodującego MMP-2 nie wpływa na zmiany neurodegeneracyjne u myszy po ischemii ogniskowej (Asahi i wsp. 2001a). Nie stwierdzono także neuroprotektoryjnego efektu selektywnego inhibitora MMP-2 na neurony w skrawkach hipokampa (Jourquin i wsp. 2003).

Dotychczas nie określono w sposób jednoznaczny, które komórki ośrodkowego układu nerwowego są głównym źródłem metaloproteaz w patologii niedokrwienia. W warunkach fizjologicznych ekspresja obu badanych izoform ma miejsce zarówno w neuronach jak i komórkach glejowych – astrocytach i oligodendrocytach oraz w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych (Uhm i wsp. 1998, Oh i wsp. 1999, Vecil i wsp. 2000, Nguyen i wsp. 2001, Muir i wsp. 2002, Arkell i Jackson 2003).

Z analizy dostępnych danych literatury można wnioskować, że lokalizacja topograficzna wzmożonej aktywności MMPs po epizodzie niedokrwiennym zależy od badanego modelu eksperymentalnego. Podjęte przez nas próby określenia lokalizacji MMPs na poziomie komórkowym metodą podwójnego znakowania nie zostały uwieńczone powodzeniem z przyczyn technicznych. Przeciwciała znakujące białka specyficzne dla neuronów czy też mikrogleju, dające pozytywne reakcje w tkance nerwowej szczurów i myszy, w przypadku myszokoczka mongolskiego nie działały. Jedynie specyficzne dla astrocytów przeciwciało anti-GFAP dawało pozytywną reakcję na skrawkach mózgu myszokoczka. Uzyskane przez nas wyniki (nie zamieszczone w tej pracy) wskazują, że krótkotrwałe niedokrwienie przodomózgowia nie miało wpływu na aktywność MMPs w komórkach astrogleju. Wynik ten pozostaje w zgodzie z wcześniejszą obserwacją, wskazującą na brak związku czasowo-przestrzennego indukcji astrocytozy z inicjacją sygnału prowadzącego do opóźnionej śmierci neuronów po niedokrwieniu (Domańska-Janik i wsp. 2001). Odpowiedź astrocytów wpisuje się raczej w schemat ogólnej odpowiedzi tkanki na uszkodzenie jej struktury i uczestniczy w formowaniu późnej blizny glejowej we wrażliwym na niedokrwienie sektorze CA1.

Na podstawie cech morfologicznych komórek widocznych na rycinach ilustrujących aktywność *in situ* na skrawkach mózgu myszokoczka mongolskiego można wnioskować, że będący wykładnikiem aktywności MMPs wzrost fluorescencji po 24 - 48 godzinach reperfuzji jest związany głównie z komórkami piramidowymi sektora CA1. Natomiast przy wydłużonym czasie reperfuzji oprócz nielicznych komórek piramidowych o niezmiennych cechach morfologicznych ułożonych na granicy sektora CA1/CA2, głównym źródłem

MMPs staje się mikroglej. Opisana wcześniej poniedokrwienna aktywacja mikrogleju w strukturze CA1, obserwowana po 72 godzinach reperfuzji w takim samym modelu eksperymentalnym (Domańska-Janik i wsp. 2001), wykazuje ścisłą korelację czasową ze wzrostem aktywności MMPs. Wyniki te pozostają w zgodzie z podkreślaną przez innych badaczy rolą mikrogleju jako źródła MMPs w innych modelach niedokrwienia (Gottschall i wsp. 1995, Cross i Woodrooffe 1999, Rivera i wsp. 2002). Na podkreślenie zasługuje widoczna lokalizacja aktywności proteolitycznej w jądrach komórkowych. Zgodnie z ostatnimi sugestiami, funkcją metaloproteaz w jądrach komórkowych może być proteolityczna inaktywacja polimerazy PARP, enzymu zaangażowanego w naprawę DNA (Kwan i wsp. 2004).

Po 72 godzinach reperfuzji obserwowaliśmy także wzmożoną aktywność proteolityczną w naczyniach krwionośnych, prawdopodobnie w komórkach śródbłonna tworzących barierę krew-mózg i odpowiadających za przejściowe uprzepuszczalnienie bariery, w stopniu nie pozwalającym jednak na przenikanie elementów morfotycznych krwi do mózgu.

Mechanizm odpowiedzialny za poniedokrwienną indukcję aktywności MMP-9 nie został zdefiniowany w sposób jednoznaczny. Do szeroko dyskutowanych, podstawowych mechanizmów regulacji MMPs w przebiegu licznych procesów patofizjologicznych należy transkrypcja genów, aktywacja proenzymów oraz inhibicja MMPs przy udziale endogennych inhibitorów tkankowych – TIMPs (Nagase 1997).

Ponieważ gen indukowanej metaloproteazy 9 posiada w rejonie promotora sekwencję wiążącą czynnik transkrypcyjny AP1 (Bian i Sun 1997, Leppert i wsp. 2001), logicznym następstwem tego faktu wydawało się być założenie, że indukcja MMP-9 po 5-ciu minutach ischemii całkowitej może być konsekwencją podwyższenia poziomu białka AP1 w czasie reperfuzji (Yoneda i wsp. 1997, 1998). Badania przeprowadzone w naszej pracowni wykazały, że wzór odpowiedzi AP-1 na niedokrwienie jest bardzo podobny w obu badanych rejonach hipokampa (Zabłocka i wsp. 2003), co raczej stawia pod znakiem zapytania jego udział jako czynnika krytycznego, odpowiadającego za wzrost aktywności MMP-9 wybiórczo w sektorze CA1. Być może decydujące znaczenie w regulacji MMP-9 mają inne czynniki transkrypcyjne np. NF κ B. W rejonie promotora genu MMP-9 znajduje się sekwencja wiążąca ten czynnik transkrypcyjny (Huhtala i wsp. 1991). Istnieją jednak sprzeczne doniesienia na temat indukcji NF κ B po całkowitym, przejściowym niedokrwieniu mózgu. Zgodnie z opinią jednej z grup badawczych, wzrost ekspresji tego czynnika po 72 godzinach reperfuzji ma

miejsce we wszystkich rejonach hipokampa (Domańska-Janik i wsp. 2001). Inni autorzy obserwowali ten efekt jedynie w rejonie CA1 (Clemens i wsp. 1997).

Badania astrocytów i komórek mikrogleju w hodowlach *in vitro* wykazały udział cytokin prozapalnych interleukiny 1 beta (IL-1 β), interleukiny 6 (IL-6) i czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF α) w regulacji ekspresji metaloproteaz (Gottschall i Debb 1996, Giraudon i wsp. 1997). Ponieważ ekspresja tych cytokin w mózgu rośnie po indukcji niedokrwienia całkowitego (Saito i wsp. 1996), mogą one stanowić potencjalny mechanizm regulacji MMPs w niedokrwionym mózgu.

W prezentowanych badaniach nie znaleźliśmy znaczących różnic w poziomach ekspresji genu MMP-9 po niedokrwieniu w odniesieniu do zwierząt kontrolnych. Można zatem przypuszczać, że aktywacja MMP-9 w rejonie CA1 hipokampa po krótkotrwałym zatrzymaniu dopływu krwi jest raczej wynikiem modyfikacji potranslacyjnych. Metaloproteaza 9 jest białkiem o wysokim stopniu glikozylacji (Wilhelm i wsp. 1989), co może pośrednio sugerować potencjalną podatność tego białka na potranslacyjne modyfikacje (Kotra i wsp. 2002). Prawdopodobnym, odkrytym niedawno mechanizmem potranslacyjnym aktywacji MMP-9 jest S-nitrozylacja, związana ze wzrostem tlenku azotu po niedokrwieniu (Gu i wsp. 2002). Podanie inhibitora neuronalnej syntazy tlenku azotu (nNOS) lub wycofanie genu kodującego tę syntazę obniżało znacząco aktywność MMP-9 po indukcji niedokrwienia ogniskowego. Jednak w modelu 5 minutowego niedokrwienia przodomózgowia myszokoczka mongolskiego nie stwierdzono wzrostu poziomu tlenku azotu w rejonie CA1 hipokampa (Lei i wsp. 1999). Jest zatem mało prawdopodobne, że proces S-nitrozylacji jest odpowiedzialny za wzrost aktywności MMP-9 w rejonie CA1 hipokampa myszokoczka mongolskiego po ischemii.

Innym z rozważanych mechanizmów, odpowiedzialnych za wzrost aktywności MMP-9 po niedokrwieniu, może być aktywacja proenzymów. Syntetyzowane w komórkach nieaktywne formy metaloproteaz są natychmiast uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i tam aktywowane na drodze ograniczonej proteolizy, polegającej na odcięciu fragmentu propeptydu (Murphy i wsp. 1994, Nagase 1997). Zgodnie z tym schematem obie formy MMPs (aktywną i nieaktywną) zidentyfikowano na zymogramach ekstraktów mózgow szczerów i myszy (Zhang i wsp. 1998, Rivera i wsp. 2002, Szklarczyk i wsp. 2002, Zhao i wsp. 2006). W prowadzonych przez nas badaniach nie stwierdziliśmy obecności prążków odpowiadających aktywnym formom metaloproteaz na żelu poliakrylamidowym. Obserwowana przez nas aktywność żelatynolityczna w hipokampie mózgu myszokoczka odpowiadała jedynie ruchliwości elektroforetycznej proenzymów.

Analogiczne wyniki opisywali także inni autorzy (Fini i wsp. 1996; Rosenberg i wsp. 1996; Clark i wsp. 1997; Mohan i wsp. 2000, Lee i wsp. 2004). Fakt ten pozostawał niewytłumaczalny do momentu odkrycia, że latentne zymogeny mogą być aktywowane *in vitro* przez surfaktanty (związki czynne powierzchniowo) takie jak SDS (Springman i wsp. 1990). Taki rodzaj aktywacji nie wymaga proteolizy zymogenu (Kherif i wsp. 1998; Zhang i wsp. 1998). Tym niemniej, brak prążków o masie cząsteczkowej charakterystycznej dla aktywnych MMP-2 i MMP-9 na żelu poliakrylamidowym nie wyklucza obecności tych form enzymów lokalnie w pewnych tylko obszarach mózgu. Potwierdzeniem tego założenia jest prezentowana w tej pracy aktywność MMPs na skrawkach mózgu. Wydaje się zatem, że proteolityczne cięcie proenzymów może mieć miejsce jedynie w pewnych odosobnionych rejonach hipokampa i detekcja aktywnych form enzymów nie jest możliwa przy zastosowaniu zymografii żelowej całych ekstraktów analizowanych fragmentów tkanki. Należy również pamiętać o tym, że aktywne MMPs ulegają natychmiastowej degradacji (Yu i Stamenkovic, 1999) i w związku z tym w tkance ilość aktywnych form enzymów może być bardzo niska, poza zasięgiem czułości stosowanych metod.

Ważnym mechanizmem modulacji aktywności metaloproteaz jest obecność specyficznych endogennych inhibitorów tkankowych - TIMPs. Niestety, brak specyficznych przeciwciał uniemożliwił nam określenie poziomu tego białka w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego. Podjęte przez nas próby oznaczania aktywności inhibitora metodą odwróconej zymografii (Gasche i wsp. 1999) nie dały również pozytywnych rezultatów. Okazały się one niewystarczająco czułe, co może świadczyć jedynie o niskiej aktywności inhibitorów. Chociaż publikowane wyniki badań w modelu ischemii ogniskowej nie wykazały zmian poziomu TIMP-1, inhibitora specyficznego dla MMP-9, pytanie o udział TIMP-1 w niedokrwieniu przodomózgowia myszokoczka mongolskiego pozostaje nadal bez odpowiedzi.

Na podstawie wyników uzyskanych w tej części pracy można postulować, że wzrost aktywności metaloproteaz w rejonie CA1 hipokampa może mieć związek z ewolucją opóźnionego uszkodzenia poniedokrwiennego, obserwowanego po upływie 3-4 dni od momentu indukcji ischemii. Powstaje zatem pytanie, w jaki sposób wzrost aktywności MMPs po czasowym niedokrwieniu przodomózgowia myszokoczka mongolskiego przekłada się na obumieranie komórek neuronalnych w sektorze CA1 hipokampa.

Wśród proponowanych hipotez, które będą omawiane w dalszej części dyskusji, najwięcej zwolenników zyskała hipoteza poparta wynikami badań biochemicznych zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, że przyczyną śmierci komórek nerwowych po niedokrwieniu mózgu jest

niekontrolowana degradacja białek macierzy zewnątrzkomórkowej przy udziale metaloproteaz. Jak wykazały badania *in vitro*, prowadzone na komórkach nie-neuronalnych, modyfikacji proteolitycznej ulegają także substraty zewnątrzkomórkowe, nie będące elementami macierzy. Do substratów tych należą kadheryny pośredniczące w kontakcie komórka-komórka (Herren i wsp. 1998, Steinhusen i wsp. 2001). Jednak rola degradacji tych białek *in vivo* w układzie nerwowym nie została jeszcze poznana.

W toku prowadzonych badań sprawdziliśmy zatem, czy aktywacja metaloproteaz w hipokampie myszokoczka mongolskiego jest zbieżna czasowo i przestrzennie ze zmianami poziomu jednego z podstawowych białek macierzy – lamininy. Wybór lamininy podyktowany był jej rolą jako czynnika promującego przeżycie komórki. Zaobserwowano, iż obecność lamininy w środowisku wydłuża czas przeżycia neuronów dopaminergicznych (Dong i wsp. 1994). Stwierdzono również, że białko to zapobiega apoptozie w modelu ekscytotoksyczności (Gary i Mattson 2001), natomiast degradacja lamininy koreluje z utratą neuronów piramidowych (Chen i Strickland 1997, Chen i wsp. 2003).

Wyniki otrzymane w toku naszych badań wskazały korelację aktywności MMP-9 i degradacji lamininy z topografią opóźnionych zmian w neuronach wywołanych niedokrwieniem. Zgodnie z pracą Tsirka i wsp. (1997) laminina może być degradowana również przez inne zewnątrzkomórkowe enzymy proteolityczne, między innymi plazminę. Jednak zahamowanie proteolizy lamininy w wyniku wyłączenia genu kodującego MMP-9 (Asahi i wsp. 2001), bądź też po podaniu inhibitora o dużym powinowactwie do metaloproteazy 9 myszom, u których wywoływano ischemię ogniskową (Gu i wsp. 2005), świadczą o zaangażowaniu właśnie tej izoformy enzymu w opisywany schemat odpowiedzi na niedokrwienie.

Podjęte przez nas próby uzyskania bezpośredniego dowodu, wskazującego na udział MMP-9 w degradacji lamininy w stosowanym modelu niedokrwienia, nie zakończyły się sukcesem. Komercyjnie dostępny inhibitor GM6001, podawany zwierzętom zgodnie z protokołami opisanymi w piśmiennictwie, nie zapobiegał poniedokrwiennej aktywacji metaloproteaz *in vivo*, aczkolwiek hamował aktywność enzymatyczną *in vitro*. Przyczyną mogło być niedostateczne stężenie tego związku w hipokampie mózgu po podaniu dootrzewnowym, ze względu na utrudnioną penetrację przez barierę krew-mózg.

Istnieje pełna zgodność, że w niedokrwieniu ogniskowym patologiczna rola MMPs wynika najprawdopodobniej z degradacji błony podstawnej naczyń krwionośnych. Jednym z podstawowych elementów tej błony jest właśnie laminina. Proteoliza białek błony podstawnej prowadzi do przerwania ciągłości bariery krew-mózg i obrzęku mózgu, do którego przenikają

elementy morfotyczne krwi, stanowiące dodatkowe źródło metaloproteaz (Rosenberg 1995, Mun-Bryce i Rosenberg 1998, Romanic i wsp. 1998, Gidday i wsp. 2005). Na związek przyczynowy pomiędzy indukowaną przez MMP-9 degradacją lamininy i obumieraniem komórek nerwowych w wyniku niedokrwienia ogniskowego wskazują wyniki badań opublikowane przez Gu i wsp. (2005). Uczni ci zaobserwowali, że podanie domózgowe przeciwciała skierowanego przeciw lamininie zwierzętom ischemicznym zносиło korzystny efekt inhibitora MMPs i powodowało śmierć neuronów w okolicach dotkniętych niedokrwieniem.

Opisane mechanizmy, specyficzne dla niedokrwienia o charakterze ogniskowym, nie wydają się pełnić ważnej roli w niedokrwieniu całkowitym, o umiarkowanym stopniu nasilenia, nie uszkadzającym bariery krew-mózg. Wydaje się, że w całkowitym niedokrwieniu mózgu reakcja MMPs jest prawdopodobnie „wpisana w schemat” lokalnej odpowiedzi tkanki na stres ischemiczny. Tym bardziej, że przebiega ona według odmiennego wzoru w różniących się wrażliwością na niedokrwienie strukturach hipokampa. Konsekwencją aktywacji MMPs po czasowym niedokrwieniu przodomózgowia jest prawdopodobnie przemodelowanie macierzy zewnątrzkomórkowej sektora CA1 hipokampa w takim stopniu, że prowadzi ono do zaburzenia homeostazy komórka – macierz zewnątrzkomórkowa. Końcowym efektem tego procesu może być śmierć komórek nerwowych, określana terminem „anoikis” (Murtoimaki i wsp. 1995, Chen i Strickland 1997). Terminem tym, jak już wcześniej wspomniano, określa się śmierć komórek spowodowaną utratą kontaktu z macierzą (Frisch i Francis, 1994).

W przebiegu dyskusji nad rolą metaloproteaz w niedokrwieniu nie można pominąć ich udziału w procesach naprawczych uszkodzonej tkanki, wymagających przemodelowania ECM (Yong i wsp. 2001). Podczas gdy w ostrej fazie uszkodzenia niekorzystny efekt aktywacji MMPs może być związany z nadmierną degradacją macierzy zewnątrzkomórkowej i uszkodzeniem neuronów, to w późnym okresie reperfuzji metaloproteazy uczestniczą prawdopodobnie w neuroplastyczności i angiogenezie (Rosenberg i wsp. 1995, Szklarczyk i wsp. 2002, Zhao i wsp. 2006a). Rosnąca liczba dowodów wskazuje na funkcjonalne znaczenie MMP-9 w formowaniu pamięci w czasie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) (Meighan i wsp. 2006), molekularnego modelu procesów pamięci i uczenia się (Silva i wsp. 1992, Lisman 1994). Wiadomo, że nawet krótka, trwająca 5 minut, ischemia eksperymentalna u zwierząt, czy nagłe zatrzymanie krążenia (cardiac arrest) u ludzi, mogą prowadzić do czasowego ograniczenia zdolności przyswajania nowych informacji (Ohno i wsp. 1994). Na tle tych danych przemodelowanie ECM z udziałem MMPs w późnej

fazie reperfuzji mogłoby mieć znaczący wpływ na konsolidację procesów pamięciowych. Ograniczenie czasu prowadzenia zaplanowanych badań do 72 godzin od momentu indukcji niedokrwienia nie pozwoliło na sprawdzenie słuszności proponowanej hipotezy po niedokrwieniu przodomózgowia.

Sygnal z macierzy zewnątrzkomórkowej przekazywany jest do komórki za pośrednictwem receptorów integrynowych. Laminina, obok innych białek macierzy, jest znanym ligandem tych receptorów. Powstające na drodze proteolizy fragmenty lamininy, jak również fragmenty innych elementów białkowych macierzy, mogą wiązać się z innymi klasami integryn, aniżeli białko natywne. W wyniku tych zdarzeń może dojść do stymulacji innych wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych z równoczesnym zablokowaniem szlaku przekazywania związanego ściśle z przeżyciem komórki (Gary i Mattson 2001, Szaniawska i wsp. 2001, Gary i wsp. 2003).

Logicznym ciągiem podjętych przez nas badań było sprawdzenie jak proteoliza białek ECM zmienia wewnątrzkomórkowe drogi sygnałowe. Według istniejącej wiedzy, opartej głównie na badaniach *in vitro*, kluczowym „łącznikiem”, wiążącym zmiany zachodzące w środowisku zewnątrzkomórkowym z odpowiedzią komórki, jest nie-receptorowa fokalna kinaza tyrozynowa FAK. Kinaza ta jest aktywowana/fosforylowana poprzez wiązanie białek macierzy do receptorów integrynowych, po czym sygnał jest przekazywany na dalsze etapy w kaskadzie fosforylacji określonych substratów (Parsons 2003). W pierwszych godzinach reperfuzji obserwowaliśmy wzrost aktywności kinazy FAK w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego, wyrażony zwiększeniem stopnia ufosforylowania reszt tyrozynowych białkowego łańcucha enzymu. Wydłużony czas reperfuzji prowadził natomiast do znaczącego obniżenia stopnia fosforylacji o około 50% w porównaniu z warunkami kontrolnymi.

Nasza dotychczasowa wiedza na temat regulacji aktywności kinazy FAK oparta jest głównie na wynikach badań *in vitro* hodowli komórek nie-neuronalnych. Zebrane dowody wskazują, że etapem kluczowym dla aktywacji tego enzymu, czyli fosforylacji reszt tyrozyny znajdujących się na domenie katalitycznej kinazy FAK, jest pierwotna autofosforylacja tyrozyny umieszczonej w pozycji 397, mieszczącej się na końcu aminowym łańcucha polipeptydowego. Reakcja ta prowadzi do zmiany konformacji enzymu, przez co tworzy się miejsce wiążące domenę SH2 kinazy Src. Dopiero utworzenie tego kompleksu umożliwia dalszą sekwencyjną fosforylację kinazy FAK przy udziale kinazy Src. Ufosforylowana zostaje tyrozyna 576/577 w centrum aktywnym kinazy FAK a następnie tyrozyna 925. Fosforylacja

wymienionych reszt tyrozynowych utrzymuje kinazę w stanie aktywnym (Schlaepfer i wsp. 1999, Parsons 2003).

O roli kinazy Src jako aktywatora kinazy FAK świadczą dane uzyskane zarówno w badaniach *in vitro* komórek nie-neuronalnych, nie wykazujących ekspresji Src, czy też hodowli prowadzonych w obecności inhibitora tej kinazy. W obu przypadkach fosforylacja reszt tyrozynowych kinazy FAK, zarówno Tyr-397 jak i Tyr-576/577, ulegała znacznej redukcji, a więc funkcjonalnemu zahamowaniu aktywności (Schlaepfer i wsp. 1994, Salazar i Rozengurt 2001).

Badania *ex vivo* będące przedmiotem prezentowanej pracy wykazały po raz pierwszy, że niedokrwienie mózgu prowadzi do zahamowania autofosforylacji Tyr-397 i obniżenia asocjacji z kinazą Src. Znaczące obniżenie immunoreaktywności fosfotyrozyny 397 w czasie 24 - 72 godzin po wywołaniu stresu ischemicznego koreluje ze spadkiem całkowitej aktywności enzymu. W świetle tych wyników można postulować, że autofosforylacja jest etapem determinującym aktywność FAK także *in vivo*. Inny mechanizm zahamowania poniedokrwiennej autofosforylacji mógłby zakładać bliżej niezidentyfikowane potranslacyjne modyfikacje enzymu, dające w efekcie zablokowanie lub uniemożliwienie rozpoznania miejsca wiążącego ATP na molekułę kinazy. Jednak w naszych badaniach *ex vivo* i w badaniach innych autorów *in vitro* inaktywacja enzymu wydaje się być zbieżna z redukcją interakcji kinazy FAK z kinazą Src (Salazar i Rozengurt 2001, Kang i wsp. 2004). Postuluje się zatem, że zahamowanie autofosforylacji zmniejsza własności asocjacyjne i prowadzi w efekcie do inhibicji enzymu.

Negatywna regulacja poziomu ufosforylowanej formy enzymu może być związana z aktywnością fosfataz tyrozynowych. Niektórzy autorzy podkreślają udział fosfatazy SHP-2 (Yu i wsp. 1998, Manes i wsp. 1999, Wang i wsp. 2005) oraz fosfataz PTP-1B i PTP-PEST w defosforylacji kinazy FAK w układach *in vitro* (Angers-Loustau i wsp. 1999a, Angers-Loustau i wsp. 1999b, Davidson i wsp. 2001, Zhang i wsp. 2006). Nasza aktualna wiedza odnośnie roli tych enzymów ma jedynie fragmentaryczny charakter i nie jest możliwe precyzyjne określenie roli wymienionych fosfataz *in vivo*.

Defosforylację reszty tyrozyny 397 obserwowaliśmy głównie we wrażliwym na niedokrwienie rejonie CA1 hipokampa, aczkolwiek niewielki, występujący dopiero po 72 godzinach, spadek fosfotyrozyny miał miejsce także w opornym na niedokrwienie brzuszynym fragmencie hipokampa. Zgodnie z publikowanymi w ostatnich latach wynikami badań skrawków hipokampa poddanych anoksji a następnie reperfuzji, zahamowanie autofosforylacji kinazy FAK ma prowadzić do śmierci neuronów (Dahmani i wsp. 2004).

Jak już zaznaczono wcześniej, bezpośrednią konsekwencją defosforylacji tyrozyny 397 jest osłabienie zdolności kinazy FAK do interakcji z najważniejszym prawdopodobnie partnerem molekularnym – kinazą Src. Analogiczne wyniki – obniżenie fosforylacji tyrozyny 397 i poziomu kompleksu FAK/Src uzyskali autorzy jedynej opublikowanej dotychczas pracy prowadzonej w układzie *in vivo*, w modelu szoku elektrycznego (elektrowstrząsu) (Kang i wsp., 2004). Nasze obserwacje jak i wyniki Kanga i wsp. (2004), choć otrzymane przy użyciu różnych modeli eksperymentalnych, wskazują na związek fosforylacji tyrozyny 397 i asocjacji kinaz FAK i Src w mózgu. W oparciu o dane literaturowe można wnioskować, że zahamowanie tworzenia kompleksu kinaz FAK/Src uniemożliwia fosforylację/aktywację obu enzymów, a więc i aktywację licznych dróg sygnałowych, z których niektóre wydają się konieczne dla przeżycia komórek (Schlaepfer i wsp. 1998, Igishi i wsp. 1999, Liu i wsp. 2004).

Mechanizm aktywacji kinazy FAK poprzez interakcję z kinazą Src jest wpisany w schemat przekazywania sygnału z ECM za pośrednictwem receptorów integrynowych. Na podstawie wyników badań *in vitro* okazało się, że aktywność kinazy FAK może być regulowana przez niektóre receptory sprzężone z białkami G, których aktywność ulega zmianom w wyniku niedokrwienia. Mechanizm ten wyklucza udział kinazy Src (Salazar i Rozengurt, 2001). Ścisła korelacja obniżenia stopnia autofosforylacji tyrozyny 397 i poziomu asocjacji kinaz FAK i Src sugeruje, że w hipokampie mózgu dominuje droga sygnałowa zależna od Src. Nie można jednak wykluczyć zupełnie roli drugiego z opisywanych mechanizmów. Zatem stan aktywacji kinazy FAK może być wypadkową osłabienia czy przerwania kontaktu komórki z macierzą zewnątrzkomórkową i modulacji sygnałów inicjowanych np. przez receptory związane z białkami G (Sharma i Kumar 1998).

W naszych badaniach spadek fosforylacji kinazy Src notowany był po 24 godzinach reperfuzji i był zbieżny z obniżeniem wiązania tego enzymu z kinazą FAK. Po następnej dobie reperfuzji obserwuje się wyraźną tendencję do powrotu aktywności kinazy Src do poziomu wyjściowego. Wyniki badań *in vitro* hodowli komórek nie-neuralnych wskazują, że prawdopodobnym aktywatorem kinazy Src może być kinaza PYK2 (Schlaepfer i wsp. 1999, Avraham i wsp. 2000, Park i wsp. 2004). Poischemiczny powrót aktywności kinazy Src, mógłby mieć znaczenie dla podjęcia samodzielnej, niezależnej od kinazy FAK funkcji. Kinaza Src posiada zdolność fosforylacji całego szeregu substratów. Substratami tymi są między innymi receptory NMDA (Kalia i wsp. 2004) oraz kanały jonowe m.in. kanał wapniowy typu L (ang. L-type calcium channel), receptor TRPC (ang. C-type transient

receptor potential channel), oraz kanałów HCN (ang. hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels) (Zong i wsp. 2005, Dubuis i wsp. 2006, Kawasaki i wsp. 2006).

Interesującą obserwacją dokonaną w toku naszych badań jest fakt, że spadek aktywności katalitycznej kinazy FAK w wyniku niedokrwienia korelował z obniżeniem ilości białka FAK, wynikającym z degradacji proteolitycznej. Jednak pomimo redukcji poziomu białka FAK po 24 godzinach reperfuzji do 50% wartości kontrolnej, średni poziom aktywnego/ufosforylowanego na resztach tyrozynowych enzymu w tym punkcie czasowym jest zbliżony do poziomu wyjściowego z powodu znacznych różnic otrzymanych wartości. I tak, w hipokampach niektórych zwierząt poziom ufosforylowanych reszt tyrozynowych był zredukowany do 60% wartości prezentowanej przez zwierzęta kontrolne, podczas gdy u innych osobników wzrastał do poziomu 140% w stosunku do kontroli. Fakt ten może wynikać z przesuniętych w czasie odpowiedzi poszczególnych zwierząt na niedokrwienie. Ten punkt czasowy może być etapem krytycznym, w którym wczesne odpowiedzi kompensacyjne związane ze wzrostem fosforylacji przeciwstawiają się dwóm procesom - proteolizie i defosforylacji, związanymi raczej ze śmiercią komórek nerwowych obserwowaną po upływie 3 - 4 dni po niedokrwieniu.

Proteolitycznemu rozpadowi ulega także kinaza Src. Zebrane dowody eksperymentalne wskazują, że degradacja ta może być wynikiem działania zarówno kaspaz jak i zależnych od wapnia kalpain (Levkau i wsp. 1998 Kook i wsp. 2000, Carragher i wsp. 2001, 2002). Należy zaznaczyć, że obie klasy enzymów ulegają aktywacji w modelu ischemii przodomózgowia (Neumar i wsp. 2001, Zhan i wsp. 2001, Ziemka-Nałęcz i wsp. 2003).

Prowadzone przez nas równoległe badania na ekstraktach hipokampa wykazały zdolność wapniowo-zależnych proteaz - kalpain do degradacji kinazy FAK. Obecność w układzie inhibitora kalpains MDL 28170 jak i chelatora wapnia EGTA, hamowała degradację badanego białka (Zalewska i wsp. 2005). Zgodnie z wzorem degradacji proteolitycznej z udziałem kalpain, katalityczna domena kinazy FAK odcięta zostaje od jej domeny regulatorowej, co uniemożliwia fosforylację licznym, opisanych we wstępie pracy, partnerów molekularnych. Dane piśmiennictwa sugerują, że proteoliza tej kinazy wpisana jest w program prowadzący do śmierci komórki (Cooray i wsp. 1996). Jakkolwiek wiedza nasza na temat regulacji sygnału integrynowego przez kalpains w hipokampie mózgu po niedokrwieniu ma charakter fragmentaryczny, można przypuszczać, że w podobny sposób mogą być modulowane inne kluczowe białka sygnałowe leżące na szlaku przekazywania. Natomiast w przeciwieństwie do wzmożonej proteolizy kinazy FAK, w środowisku aktywującym kalpains tylko 20% kinazy Src ulegało degradacji, aczkolwiek proces ten był

hamowany w obecności EGTA i inhibitora kalpajny (Zalewska i wsp. 2005). Zatem za degradację kinazy Src wydają się odpowiadać także inne enzymy proteolityczne.

Rozstrzygnięcie, który enzym pełni dominującą rolę w poniedokrwiennej degradacji FAK, na obecnym poziomie wiedzy wydaje się niemożliwe ze względu na wzajemne interakcje układów kalpajny i kaspaz. W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że proteoliza pewnej grupy kaspaz przez kalpajnę prowadzi do zahamowania aktywności tych enzymów, natomiast w przypadku kaspazy 3 ułatwia jej hydrolizę do formy aktywnej. Z kolei kaspaza 3 proteolizując wraz z kalpajną endogenne inhibitory kalpajny – kalpastatynę, może pośrednio przyczynić się do stymulacji aktywności proteolitycznej (Blomgren i wsp. 2001).

Na podstawie prezentowanych wyników można wnioskować, że obok procesu fosforylacji, uważanej za najważniejszy mechanizm regulacji przekazywania sygnałów przez kinazę FAK w różnych fizjopatologicznych sytuacjach, proteolityczna degradacja kinaz FAK i Src wydaje się odgrywać równie ważną rolę.

Na tle obniżonej aktywności katalitycznej i redukcji poziomu białka kinazy FAK po epizodzie niedokrwinnym, zaskakującym jest brak zmian asocjacji kinazy z drugim badanym partnerem molekularnym – białkiem p130 Cas. Interakcja tych molekuł jest uważana za jeden z ważnych etapów przekazywania sygnałów z ECM za pośrednictwem integrzyn. W tworzeniu kompleksu FAK/Cas udział bierze domena SH3 białka Cas wiążąca się do bogatego w prolinę końca karboksylowego kinazy FAK (Polte i Hanks 1995, 1997; Schaller i Parsons 1995). Jakkolwiek badania *in vitro* sugerują, że zahamowanie fosforylacji tyrozyny 397 kinazy FAK uniemożliwia jej asocjację z białkiem Cas (Schlaepfer i Hunter, 1997), nie wykazaliśmy takiej zależności w hipokampie myszokoczka mongolskiego po zatrzymaniu dopływu krwi do mózgu. Należy zaznaczyć, że poziomy kompleksu FAK/Cas w obrębie badanych grup eksperymentalnych charakteryzowały się dużą zmiennością u poszczególnych zwierząt. Zmienność ta mogła wynikać z niestabilnego charakteru asocjacji badanych białek.

Istniejący stan wiedzy nie pozwala na precyzyjne określenie roli, jaką odgrywa kompleks FAK/Cas w hipokampie po niedokrwieniu. Badania *in vitro* sugerują, że asocjacja tych dwóch molekuł może prowadzić do aktywacji związanej z przeżyciem kinazy ERK, natomiast indukowany sygnał jest zbyt słaby, prawdopodobnie niewystarczający do podtrzymania procesów życiowych komórki (Vuori i wsp. 1996; Schlaepfer i wsp. 1997).

Zgodnie z danymi uzyskanymi z eksperymentów *in vitro*, białko p130 Cas może wiązać się z kinazą FAK za pośrednictwem kinazy Src. W tym przypadku domena SH3 kinazy Src wiąże się z domeną SBD (ang. C-terminal Src-binding domain) zlokalizowaną na końcu karboksylowym białka Cas (Nakamoto i wsp. 1996, Schlaepfer i wsp. 1997). Jak

wykazały nasze wyniki, w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego dochodzi do asocjacji białka Cas z kinazą Src. W odpowiedzi na niedokrwienie poziom tego kompleksu ulegał obniżeniu już po upływie 6-ciu godzin od indukcji niedokrwienia i wykazywał dalszą tendencję spadkową wraz z wydłużeniem czasu reperfuzji. Zaburzenie interakcji Cas/Src może wynikać z obserwowanej w tym samym czasie redukcji białka Src. Zmniejszenie poziomu kompleksu Src/Cas po 6-ciu godzinach przy niezmienniej asocjacji kinazy FAK/Src mogłoby wskazywać, że połączenie Src z białkiem Cas jest elementem odrębnej, niezależnej od kinazy FAK drogi sygnałowej.

Spodziewaliśmy się jednak, że prostą konsekwencją inhibicji wiązania Src/Cas będzie obniżenie ufosforylowanej formy białka adaptorowego. Zupełnie nieoczekiwanie fosforylacja tyrozyny białka Cas była niezmienną w badanym przedziale czasu po epizodzie niedokrwinnym. Utrzymanie stałego poziomu fosforylacji Cas może wynikać z zaangażowania innych, bliżej niezidentyfikowanych kinaz (Ohmori i wsp. 2000, 2001).

Co więcej, białko Cas nie ulegało degradacji proteolitycznej. Wprost przeciwnie, poziom tego białka przewyższał znacząco wartości kontrolne po 48 godzinach reperfuzji i wykazywał tendencję wzrostową, jeszcze po upływie 72 godzin. Podobnie wzrost poziomu homologu białka Cas-L (ang. Cas-lymphocyte-type) obserwowano po 20 minutowym niedokrwieniu całkowitym mózgu szczura (Sasaki i wsp. 2005). Autorzy sugerują, że białko to może być zaangażowane w poischemiczne procesy naprawcze. Mając na uwadze udział tego białka w związanej z kinazą FAK ścieżce sygnałowej, prowadzącej do aktywacji kinazy ERK, nie można wykluczyć sprzyjającej przeżyciu funkcji tego białka w niedokrwionym hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego. Może być ona jednak, jak już wspomniano wcześniej, niewystarczającym czynnikiem zabezpieczającym w obliczu stresu metabolicznego.

Obniżona autofosforylacja tyrozyny 397 we wrażliwej na ischemię strukturze CA1 korelowała topograficznie i czasowo ze wzrostem aktywności metaloproteaz i degradacją lamininy, co może wskazywać na współzależność obu odpowiedzi. Poparciem tej hipotezy mogą być wyniki badań otrzymane na miocytach (Menon i wsp. 2006). Autorzy pracy wykazali, że aktywacja MMPs prowadziła do inhibicji fosforylacji kinazy FAK na drodze bezpośredniej interakcji metaloproteaz z podjednostką β integryny (Nagy i wsp. 2006, Menon i wsp. 2006). Natomiast za późną inhibicję autofosforylacji FAK w części brzusznej hipokampa, w której nie obserwuje się utraty neuronów po epizodzie niedokrwinnym, odpowiadają prawdopodobnie mechanizmy wewnątrzkomórkowe, nie związane z MMPs.

Na podstawie tych obserwacji można postulować, że w rozgrywce toczącej się wewnątrz neuronu o przeżycie lub śmierć po przebyłym niedokrwieniu mogą być modulowane liczne ścieżki sygnałowe związane z kinazą FAK, zarówno te promujące przeżycie jak i te prowadzące do śmierci neuronów w strukturze CA1 hipokampa. Od ich równowagi funkcjonalnej zależy los neuronów po przebytej ischemii mózgu.

Liczne badania *in vitro* wskazują na rolę kinazy FAK w aktywacji dwóch efektywnych szlaków neuroprotekcyjnych. Jednym z nich jest szlak kinazowy inicjowany przez PI3K i aktywujący kinazę Akt (King i wsp. 1997, Tamura i wsp. 1999, Tan i wsp. 1999). Jeśli taka droga sygnałowa funkcjonuje *in vivo* w mózgu, początkowy, trwający 6 godzin wzrost fosforylacji w naszym modelu niedokrwienia mógłby być elementem reakcji protekcyjnej, jaka jest obserwowana w wielu procesach patofizjologicznych. Jednak występująca przejściowo w pierwszej fazie reperfuzji aktywacja Akt pojawia się zarówno we wrażliwym na niedokrwienie sektorze CA1 jak i w niewrażliwych rejonach hipokampa (Zabłocka i wsp. 2003), co poddaje w wątpliwość jej udział w kaskadzie zdarzeń prowadzących do opóźnionej śmierci neuronów. Inną efektywną drogą protekcyjną, stymulowaną przez kinazę FAK, jest aktywacja szlaku MAPK z ufosforylowaniem promującej przeżycie kinazy ERK jako substratu końcowego (Schlaepfer i Hunter 1998, Małecki i wsp. 2000, Huang i wsp. 2006).

Wyłączenie FAK ze szlaku przekazywania bodźców zewnątrzkomórkowych jest prawdopodobnie zasadniczą komponentą, prowadzącą do transdukcji sygnału ischemicznego. Faza zahamowania kinazy FAK ma charakter długotrwały i może być istotnym elementem rozwoju opóźnionej neurodegeneracji w hipokampie. Jednak udział kinazy w szerokim spektrum reakcji biochemicznych uniemożliwia precyzyjne ustalenie jej roli w rozwoju zmian wywołanych niedokrwieniem. Jednym z efektów inhibicji kinazy FAK może być zahamowanie aktywności kinazy ERK. Jakkolwiek wyniki otrzymane przez Zabłocką i wsp. (2003) wskazują na zmniejszenie aktywności kinazy ERK w rejonie CA1 hipokampa, należy zdawać sobie sprawę, że zahamowanie aktywności tej kinazy wpisane jest nie tylko w schemat zaburzonego przekazywania sygnału z udziałem kinazy FAK. Zahamowanie aktywności ERK może także wynikać z osłabienia sygnału troficznego w warunkach niedokrwienia. Istnieją pojedyncze dane w piśmiennictwie, wskazujące na synergistyczny charakter współdziałania obu dróg sygnałowych, to znaczy tych związanych z przekazywaniem sygnału z macierzy przy udziale kinazy FAK jak i tych generowanych przez czynniki troficzne. Receptory dla czynników wzrostu są optymalnie aktywowane przez specyficzne dla nich ligandy jedynie w warunkach zachowania prawidłowego kontaktu ze środowiskiem (Vuori i Ruoslati 1994, Schaller i Sasaki 1997). W przypadku potwierdzenia

tych hipotez, patologicznie zmieniony sygnał z macierzy zewnątrzkomórkowej mógłby osłabiać szlak przekazywania sygnału troficznego i prowadzić w konsekwencji do inhibicji kinazy ERK i śmierci komórki.

Z wyników badań opublikowanych w ostatnich latach wynika, że kinaza FAK inicjuje jeszcze inny sygnał pro-życiowy, poprzez wiązanie z białkiem RIP zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, co z kolei uniemożliwia interakcje RIP z receptorem śmierci (ang. death receptor complex) (Kurenova i wsp. 2004). Rola tego mechanizmu w niedokrwieniu mózgu nie została jeszcze zbadana.

Obok opisanych wyżej procesów supresyjnych dla dróg sygnałowych promujących przeżycie, przyczyną neurodegeneracji mogłaby być również utrata zdolności asocjacji enzymu nie tylko z licznymi molekułami sygnałowymi leżącymi na szlaku integrynowego przekazywania sygnałów, ale również z białkami cytoszkieletowymi, co uniemożliwia interakcję białek cytoszkieletu z błoną komórkową i prawidłowe zachowanie struktury komórki (Schlaepfer i wsp. 1999).

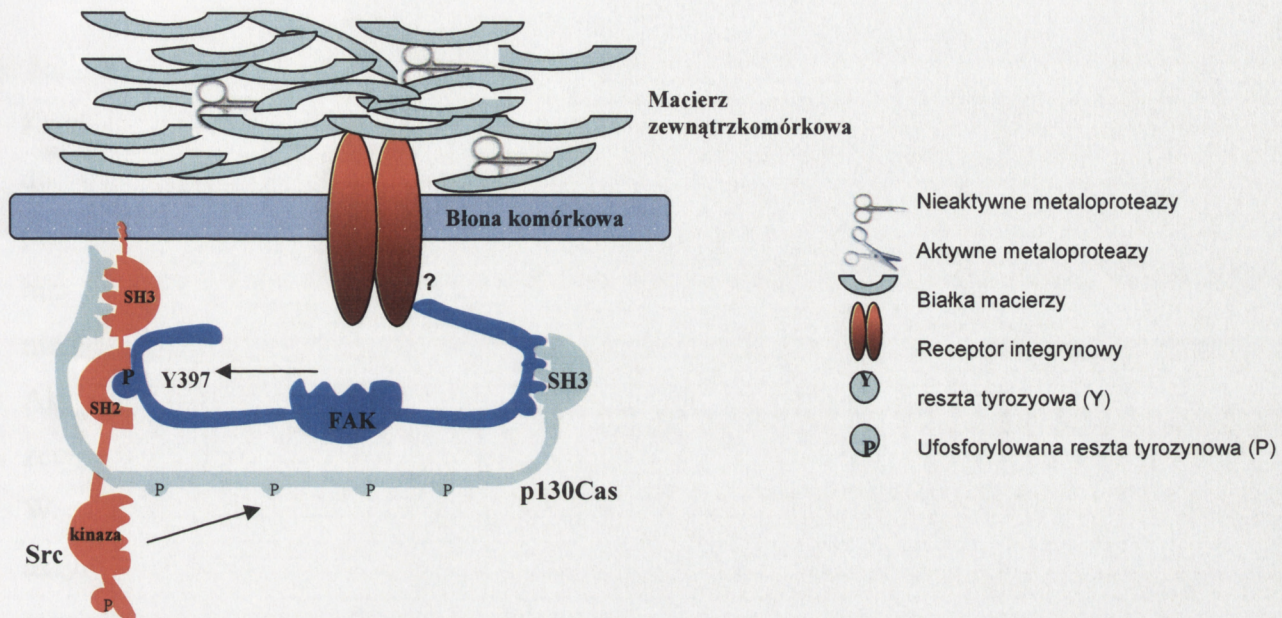
Podsumowując - nasze wyniki wskazują, że modulacja dróg sygnałowych związanych z kinazą FAK po wewnętrznej stronie błony komórkowej jest pochodną nadmiernej aktywacji zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych. W wyniku tego procesu dochodzi do degradacji białek macierzy i osłabienia lub przerwania kontaktu komórki z jej środowiskiem zewnątrzkomórkowym oraz zaburzenia komunikacji auto- i parakrynej między komórkami. Powstające w wyniku proteolizy fragmenty białek macierzy mogą wiązać się z innymi aniżeli w warunkach fizjologicznych receptorami integrynowymi. Konsekwencją może być inhibicja kinazy FAK i zahamowanie stymulowanych przez tę kinazę zewnątrzkomórkowych, pro-życiowych szlaków przekazywania i/lub aktywacja drogi sygnałowej prowadzącej do śmierci komórki.

Jak już wspomniano wcześniej, obok opisywanych zewnątrzkomórkowych procesów proteolitycznych, w mechanizm regulacji przekazywania sygnałów z ECM w niedokrwieniu jest również włączona proteoliza wewnątrzkomórkowa i defosforylacja kinazy FAK. Oba procesy przebiegają w tym samym czasie i mogą być wzajemnie od siebie zależne.

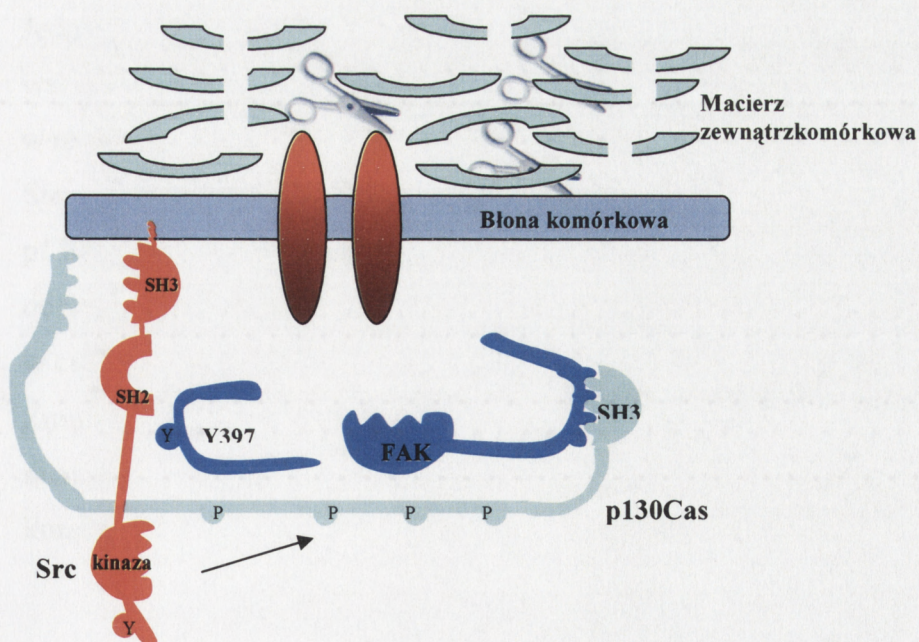
Można zaproponować następujący, z pewnością uproszczony schemat sekwencji zdarzeń w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego po 5 minutowym niedokrwieniu przodomózgowia (Ryc.28). Wpływ tych zdarzeń na komórkę nie jest ostatecznie zdeterminowany i zależy od interakcji z licznymi indukowanymi równolegle reakcjami.

Opisane odpowiedzi na niedokrwienie wydają się wyprzedzać śmierć neuronów obserwowaną po upływie 3 - 4 dni od wystąpienia epizodu niedokrwienia, czyli mogą być włączone w szlak przekazywania sygnałów z macierzy prowadzących raczej do śmierci komórki aniżeli być jej konsekwencją. Modulacja przekazywania sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej z pewnością nie jest jedynym czynnikiem, odpowiedzialnym za opóźnioną śmierć neuronów hipokampa po czasowym niedokrwieniu mózgu myszokoczka mongolskiego. Natomiast topograficzna lokalizacja zmian w rejonie CA1 w czasie reperfuzji wskazuje na udział badanych procesów w ewolucji ischemicznego uszkodzenia neuronów, razem z innymi poprzednio opisanymi procesami, takimi jak napływ wapnia, wolne rodniki czy aktywacja kalpain i kaspaz.

A)



B)



Rycina 28. Hipotetyczny schemat sekwencji zdarzeń w hipokampie mózgu myszkoczek mongolskiego kontrolnego (A) i po 5-cio minutowym niedokrwieniu przodomózgowia (B).

VI. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Wyniki badań tej pracy wykazały, że:

1. Krótkotrwałe niedokrwienie przodomózgowia myszokoczka mongolskiego prowadzi do wzrostu aktywności metaloproteaz w hipokampie w czasie 72 godzin po przywróceniu krążenia. Wzrost aktywności MMP-2 występował w całej strukturze hipokampa, natomiast aktywacja MMP-9 była ograniczona do wrażliwego na niedokrwienie rejonu CA1.
2. Aktywacji MMP-9 towarzyszy obniżenie poziomu białka macierzy zewnątrzkomórkowej – lamininy w sektorze CA1 hipokampa.
3. W wyniku niedokrwienia przodomózgowia dochodzi do zahamowania aktywności/fosforylacji wewnątrzkomórkowej kinazy tyrozynowej – FAK już na etapie autofosforylacji po upływie 24 godzin po przywróceniu krążenia. Konsekwencją tego procesu jest równoległe obniżenie asocjacji kinazy FAK z kinazą Src, reakcji koniecznej dla maksymalnej aktywności kinazy FAK.
4. Jednocześnie obserwuje się obniżenie ekspresji białek FAK i Src. Obserwacja ta wskazuje, że obok procesu fosforylacji proteoliza wydaje się odgrywać znaczącą rolę w regulacji aktywności kinaz tyrozynowych po niedokrwieniu.
5. Stres niedokrwienno nie wpływa na wiązanie kinazy FAK z białkiem adaptorowym p130Cas. Brak zmian stopnia interakcji tych dwóch białek w badanym modelu doświadczalnym wskazuje na to, że kompleks FAK/p130Cas nie odgrywa istotnej roli w ewolucji zmian poniedokrwienno.
6. Zmniejszeniu stopnia asocjacji kinazy Src z białkiem adaptorowym p130Cas po niedokrwieniu towarzyszy czasowe obniżenie ekspresji białka Src, natomiast nie koreluje ono ze zmianą stopnia ufosforylowania kinazy.

VII. WNIOSKI

Uzyskane wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Niedokrwienie przodomózgowia myszokoczka mongolskiego prowadzi do proteolitycznej przebudowy struktury macierzy zewnątrzkomórkowej w rejonie CA1 hipokampa w wyniku aktywacji metaloproteazy 9.
2. Przemodelowaniu macierzy zewnątrzkomórkowej towarzyszy osłabienie kontaktu komórki z otaczającym środowiskiem i modulacja wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału z macierzy, wykładnikiem której jest zahamowanie aktywności kinazy FAK i jej asocjacji z kinazą Src.
3. Poischemiczna degradacja proteolityczna kinazy FAK i Src pogłębia dodatkowo stopień zahamowania tej ważnej ścieżki sygnałowej z macierzy zewnątrzkomórkowej.
4. Wyłączenie kompleksu kinaz FAK/Src ze szlaku przekazywania w hipokampie może prowadzić do osłabienia zdolności adaptacyjnych komórki i być jedną z przyczyn opóźnionej śmierci neuronów po przejściowym niedokrwieniu mózgu myszokoczka mongolskiego.

PIŚMIENNICTWO

1. Akagi T, Murata K, Shishido T, Hanafusa H. v-Crk activates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway by utilizing focal adhesion kinase and H-Ras. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(20):7015-23.
2. Angers-Loustau A, Cote JF, Charest A, Dowbenko D, Spencer S, Lasky LA, Tremblay ML. Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *J Cell Biol.* 1999; 144(5):1019-31.
3. Angers-Loustau A, Cote JF, Tremblay ML. Roles of protein tyrosine phosphatases in cell migration and adhesion. *Biochem Cell Biol.* 1999; 77(6):493-505.
4. Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Esiri MM, Perry VH. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1997; 23:406-415.
5. Arai H, Passonneau JV, Lust WD. Energy metabolism in delayed neuronal death of CA1 neurons of the hippocampus following transient ischemia in the gerbil. *Metab Brain Dis.* 1986; 1(4):263-78.
6. Arkell J, Jackson CJ. Constitutive secretion of MMP9 by early-passage cultured human endothelial cells. *Cell Biochem Funct.* 2003; 21(4):381-6.
7. Asahi M, Sumii T, Fini ME, Itohara S, Lo EH. Matrix metalloproteinase 2 gene knockout has no effect on acute brain injury after focal ischemia. *Neuroreport.* 2001; 12(13):3003-7.
8. Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci.* 2001; 21(19):7724-32.
9. Avraham H, Park SY, Schinkmann K, Avraham S RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signal.* 2000; 12(3):123-33.
10. Bandtlow CE, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev.* 2000; 80(4):1267-90.

11. Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics.
J Cereb Blood Flow Metab. 1999; 19(8):819-34.
12. Blavier L, Henriot P, Imren S, Declerck YA. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer. Ann N Y Acad Sci. 1999; 878:108-19.
13. Blomgren K, Zhu C, Wang X, Karlsson JO, Leverin AL, Bahr BA, Mallard C, Hagberg H. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"?
J Biol Chem. 2001; 276(13):10191-8.
14. Bukalo O, Schachner M, Dityatev A. Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus.
Neuroscience 2001; 104(2):359-69.
15. Burgaya F, Girault JA. Cloning of focal adhesion kinase, pp125FAK, from rat brain reveals multiple transcripts with different patterns of expression.
Brain Res Mol Brain Res. 1996; 37(1-2):63-73.
16. Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases.
Mol Cell Biol. 1995; 15(2):954-63.
17. Carragher NO, Fincham VJ, Riley D, Frame MC. Cleavage of focal adhesion kinase by different proteases during SRC-regulated transformation and apoptosis. Distinct roles for calpain and caspases.
J Biol Chem. 2001; 276(6):4270-5.
18. Carragher NO, Westhoff MA, Riley D, Potter DA, Dutt P, Elce JS, Greer PA, Frame MC. v-Src-induced modulation of the calpain-calpastatin proteolytic system regulates transformation.
Mol Cell Biol. 2002; 22(1):257-69.
19. Cary LA, Chang JF, Guan JL. Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn.
J Cell Sci. 1996; 109 (Pt 7):1787-94.
20. Celio MR, Blumcke I. Perineuronal nets - a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system.
Brain Res Brain Res Rev. 1994; 19(1):128-45.
21. Chambaut-Guerlin AM, Herigault S, Rouet-Benzineb P, Roucher C, Lafuma C. Induction of matrix metalloproteinase MMP-9 (92-kDa gelatinase) by retinoic acid in human neuroblastoma SKNBE cells: relevance to neuronal differentiation.
J. Neuroch. 2000; 74:506-517.

22. Chan P.H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain.
J Cereb Blood Flow Metab. 2001; 21(1):2-14.
23. Chen HC, Appeddu PA, Isoda H, Guan JL. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase.
J Biol Chem. 1996; 271(42):26329-34.
24. Chen ZL, Indyk JA, Strickland S. The hippocampal laminin matrix is dynamic and critical for neuronal survival.
Mol Biol Cell. 2003; 14(7):2665-76.
25. Chen ZL, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin.
Cell. 1997; 91(7):917-25.
26. Choi DW. Excitotoxic cell death.
J Neurobiol. 1992; 23(9):1261-76.
27. Clark AW, Krekoski CA, Bou SS, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia.
Neurosci Lett. 1997; 238(1-2):53-6.
28. Clemens JA, Stephenson DT, Dixon EP, Smalstig EB, Mincy RE, Rash KS, Little SP. Global cerebral ischemia activates nuclear factor-kappa B prior to evidence of DNA fragmentation.
Brain Res Mol Brain Res. 1997; 48(2):187-96.
29. Collins RC, Dobkin BH, Choi DW. Selective vulnerability of the brain: new insights into the pathophysiology of stroke.
Ann Intern Med. 1989; 110(12):992-1000.
30. Cooray P, Yuan Y, Schoenwaelder SM, Mitchell CA, Salem HH, Jackson SP. Focal adhesion kinase (pp125FAK) cleavage and regulation by calpain.
Biochem J. 1996; 318 (Pt 1):41-7.
31. Corvetti L, Rossi F. Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans induces sprouting of intact Purkinje axons in the cerebellum of the adult rat.
J Neurosci. 2005; 25(31):7150-8.
32. Cross AK, Woodroffe MN. Chemokine modulation of matrix metalloproteinase and TIMP production in adult rat brain microglia and a human microglial cell line in vitro.
Glia. 1999; 28(3):183-9.
33. Cuzner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Opdenakker G, Newcombe J. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis; comparison of stages in lesion formation.

- J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1996; 55: 1194-1204.
34. Cuzner ML, Opdenakker G. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system.
J Neuroimmunol. 1999; 94(1-2):1-14.
 35. Dahmani S, Tesniere A, Rouelle D, Desmots JM, Mantz J. Thiopental and isoflurane attenuate the decrease in hippocampal phosphorylated Focal Adhesion Kinase (pp125FAK) content induced by oxygen-glucose deprivation.
Br J Anaesth. 2004; 93(2):270-4.
 36. Davidson D, Veillette A. PTP-PEST, a scaffold protein tyrosine phosphatase, negatively regulates lymphocyte activation by targeting a unique set of substrates.
EMBO J. 2001; 20(13):3414-26.
 37. Del Bigio MR, Tchelingirian JL, Jacque CM. Expression of extracellular matrix degrading enzymes during migration of xenografted brain cells.
Neuropathol. Appl. Neurobiol. 1999; 25: 54-62.
 38. Domańska-Janik K, Bronisz-Kowalczyk A, Zając H, Zabłocka B. Interrelations between nuclear-factor kappa B activation, glial response and neuronal apoptosis in gerbil hippocampus after ischemia.
Acta Neurobiol Exp 2001; 61(1):45-51.
 39. Dong JF, Detta A, Hitchcock ER. Enhanced in vitro survival and growth of foetal human mesencephalic dopaminergic neurones on laminin and collagen: implications for cell banking.
Neurosci Lett. 1994; 178(1):27-31.
 40. Dubuis E, Rockcliffe N, Hussain M, Boyett M, Wray D, Gawler D. Evidence for multiple Src binding sites on the alpha1c L-type Ca²⁺ channel and their roles in activity regulation.
Cardiovasc Res. 2006; 69(2):391-401.
 41. English WR, Puente XS, Freije JM, Knauper V, Amour A, Merryweather A, Lopez-Otin C, Murphy G. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2.
J Biol Chem. 2000; 275(19):14046-55.
 42. Fini ME, Cook JR, Mohan R, Brinckerhoff CE. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. In W.C. Parks, R.P. Mecham (Eds), Matrix metalloproteinases, Academic Press, San Diego, 1998, pp. 299-356.
 43. Fini ME, Parks WC, Rinehart WB, Girard MT, Matsubara M, Cook JR, West-Mays JA, Sadow PM, Burgeson RE, Jeffrey JJ, Raizman MB, Krueger RR, Zieske JD. Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury.
Am J Pathol. 1996; 149(4):1287-302.

44. Frolichsthal-Schoeller P, Vescovi AL., Krekoski CA, Murphy G, Edwards DR, Forsyth P. Expression and modulation of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human embryonic CNS stem cells. *Neuroreport* 1999; 10:345-351.
45. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 1994; 124(4):619-26.
46. Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9(5):701-6.
47. Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, Massengale J, Kawase M, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res.* 1999; 842(1):92-100.
48. Gadamski R, Mossakowski MJ. Asymmetric damage of the CA1 sector of Ammon's horn after short-term forebrain ischemia in Mongolian gerbils. *Neuropatol Pol.* 1992; 30(3-4):209-19.
49. Gary DS, Milhavel O, Camandola S, Mattson MP. Essential role for integrin linked kinase in Akt-mediated integrin survival signaling in hippocampal neurons. *J Neurochem.* 2003; 84(4):878-90.
50. Gary DS, Mattson MP. Integrin signaling via the PI3-kinase-Akt pathway increases neuronal resistance to glutamate-induced apoptosis. *J Neurochem.* 2001; 76(5):1485-96.
51. Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19(9):1020-8.
52. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999; 285(5430):1028-32.
53. Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289(2):H558-68.
54. Gijbels K, Masure S, Carton H, Opdenakker G. Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurologic disorder. *J. Neuroimmunol.* 1992; 41:29-34.
55. Giraudon P, Buart S, Bernard A, Belin MF. Cytokines secreted by glial cells infected with HTLV-I modulate the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and their natural inhibitor (TIMPs): possible involvement in neurodegenerative

processes.

Mol Psychiatry. 1997; 2(2):107-10.

56. Golubovskaya VM, Finch R, Cance WG. Direct interaction of the N-terminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal transactivation domain of p53. *J Biol Chem.* 2005; 280(26):25008-21.
57. Gottschall PE, Deb S. Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation.* 1996; 3(2-3):69-75.
58. Gottschall PE, Yu X, Bing B. Increased production of gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) and interleukin-6 by activated rat microglia in culture. *J Neurosci Res.* 1995; 42(3):335-42
59. Gu Z, Cui J, Brown S, Fridman R, Mobashery S, Strongin AY, Lipton SA. A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci.* 2005; 25(27):6401-8.
60. Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 2002; 297(5584):1186-90.
61. Hamann GF. Unriddling the role of matrix metalloproteinases in human cerebral stroke. *Stroke* 2003; 34:40-46
62. Han DC, Guan JL. Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. *J Biol Chem.* 1999; 274(34):24425-30.
63. Hanks SK, Calalb MB, Harper MC, Patel SK. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(18):8487-91.
64. Harte MT, Hildebrand JD, Burnham MR, Bouton AH, Parsons JT. p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 1996; 271(23):13649-55.
65. Hens MD, DeSimone DW. Molecular analysis and developmental expression of the focal adhesion kinase pp125FAK in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 1995; 170(2):274-88.
66. Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19(6):624-33.

67. Herren B, Levkau B, Raines EW, Ross R. Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell*. 1998; 9(6):1589-601.
68. Hildebrand JD, Schaller MD, Parsons JT. Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol*. 1993; 123(4):993-1005.
69. Huang D, Khoe M, Befekadu M, Chung S, Takata Y, Ilic D, Bryer-Ash M. Focal Adhesion Kinase Mediates Cell Survival Via NF- κ B and ERK Signaling Pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;
70. Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem*. 1990; 265(19):11077-82.
71. Huhtala P, Tuuttila A, Chow LT, Lohi J, Keski-Oja J, Tryggvason K. Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *J Biol Chem*. 1991; 266(25):16485-90.
72. Husi H, Grant SG. Isolation of 2000-kDa complexes of N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain. *J Neurochem*. 2001; 77(1):281-91.
73. Igishi T, Fukuhara S, Patel V, Katz BZ, Yamada KM, Gutkind JS. Divergent signaling pathways link focal adhesion kinase to mitogen-activated protein kinase cascades. Evidence for a role of paxillin in c-Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J Biol Chem*. 1999; 274(43):30738-46.
74. Jourquin J, Tremblay E, Decanis N, Charton G, Hanessian S, Chollet AM, Le Diguardher T, Khrestchatsky M, Rivera S. Neuronal activity-dependent increase of net matrix metalloproteinase activity is associated with MMP-9 neurotoxicity after kainate. *Eur J Neurosci*. 2003; 18(6):1507-17.
75. Kaczmarek L, Lapinska-Dzwonek J, Szymczak S. Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *EMBO J*. 2002; 21:6643-6648.
76. Kalia LV, Gingrich JR, Salter MW. Src in synaptic transmission and plasticity. *Oncogene*. 2004; 23(48):8007-16.
77. Kang UG, Jun SJ, Yoon SC, Jeon S, Park JB, Chung CK, Juhn YS, Kim YS. Differential regulation of FAK and PYK2 tyrosine phosphorylation after

- electroconvulsive shock in the rat brain.
Neurosci Lett. 2004; 363(2):134-8.
78. Kawasaki BT, Liao Y, Birnbaumer L. Role of Src in C3 transient receptor potential channel function and evidence for a heterogeneous makeup of receptor- and store-operated Ca²⁺ entry channels.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(2):335-40.
79. Kherif S, Dehaupas M, Lafuma C, Fardeau M, Alameddine HS. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in denervated muscle and injured nerve.
Neuropathol Appl Neurobiol. 1998; 24(4):309-19.
80. Kieseier BC, Kiefer R, Clements JM, Miller K, Wells GMA, Schweitzer T, Gearing AJ, Hartung HP. Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis.
Brain 1998; 121:159-166.
81. Kim M, Carman CV, Springer TA. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins.
Science. 2003; 301(5640):1720-5.
82. King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tsihchlis PN, Brugge JS. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation.
Mol Cell Biol. 1997; 17(8):4406-18.
83. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia.
Brain Res. 1982; 239(1):57-69.
84. Kirino T, Sano K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia.
Acta Neuropathol (Berl). 1984; 62(3):201-8.
85. Kojima S, Itoh Y, Matsumoto S, Masuho Y, Seiki M. Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP.
FEBS Lett. 2000; 480:142-146.
86. Kook S, Shim SR, Choi SJ, Ahn J, Kim JI, Eom SH, Jung YK, Paik SG, Song WK. Caspase-mediated cleavage of p130cas in etoposide-induced apoptotic Rat-1 cells.
Mol Biol Cell. 2000; 11(3):929-39.
87. Kotra LP, Zhang L, Fridman R, Orlando R, Mobashery S. N-Glycosylation pattern of the zymogenic form of human matrix metalloproteinase-9.
Bioorg Chem. 2002; 30(5):356-70.
88. Kurenova E, Xu LH, Yang X, Baldwin AS Jr, Craven RJ, Hanks SK, Liu ZG, Cance WG. Focal adhesion kinase suppresses apoptosis by binding to the death

domain of receptor-interacting protein.
Mol Cell Biol. 2004; 24(10):4361-71.

89. Kwan JA, Schulze CJ, Wang W, Leon H, Sariahmetoglu M, Sung M, Sawicka J, Sims DE, Sawicki G, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro.
FASEB J. 2004; 18(6):690-2.
90. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature. 1970; 227(5259):680-5.
91. Lauri SE, Kaukinen S, Kinnunen T, Ylinen A, Imai S, Kaila K, Taira T, Rauvala H. Regulatory role and molecular interactions of a cell-surface heparan sulfate proteoglycan (N-syndecan) in hippocampal long-term potentiation.
J Neurosci. 1999; 19(4):1226-35.
92. Lee SR, Tsuji K, Lee SR, Lo EH. Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia.
J Neurosci. 2004; 24(3):671-8.
93. Lei B, Adachi N, Nagaro T, Arai T, Koehler RC. Nitric oxide production in the CA1 field of the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia : effects of 7-nitroindazole and NG-nitro-L-arginine methyl ester.
Stroke. 1999; 30(3):669-77.
94. Leppert D, Ford J, Stabler G, Grygar C, Lienert C, Huber S, Miller KM, Hauser SL, Kappos L. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated during relapses and stable phases of multiple sclerosis.
Brain 1998; 121:2327-2334.
95. Leppert D, Lindberg RL, Kappos L, Leib SL. Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis.
Brain Res Brain Res Rev. 2001; 36(2-3):249-57.
96. Lesay A, Hickman JA, Gibson RM. Disruption of focal adhesions mediates detachment during neuronal apoptosis.
Neuroreport. 2001; 12(10):2111-5.
97. Leu TH, Maa MC. Tyr-863 phosphorylation enhances focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397.
Oncogene. 2002; 21(46):6992-7000.
98. Levkau B, Herren B, Koyama H, Ross R, Raines EW. Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis.
J Exp Med. 1998; 187(4):579-86.

99. Lipfert L, Haimovich B, Schaller MD, Cobb BS, Parsons JT, Brugge JS. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J Cell Biol.* 1992; 119(4):905-12.
100. Lisman J. The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci.* 1994; 17(10):406-12.
101. Liu G, Beggs H, Jurgensen C, Park HT, Tang H, Gorski J, Jones KR, Reichardt LF, Wu J, Rao Y. Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction. *Nat Neurosci.* 2004; 7(11):1222-32.
102. Lo EH, Wang X, Cuzner ML. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role of plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J. Neurosci. Res.* 2002; 69:1-9
103. Luo J. The role of matrix metalloproteinases in the morphogenesis of the cerebellar cortex. *Cerebellum.* 2005; 4(4):239-45.
104. Lazarewicz JW, Majewska MD, Wróblewski JT. Possible participation of calcium in the pathomechanism of ischemic brain damage. W: Mossakowski MJ, Zelman IB, Kroh M. (red.) *Pathophysiological Biochemical and Morphological Aspects of Cerebral Ischemia and Arterial Hypertension*, Pol. Med. Publ., Warszawa, 1978, 79-86.
105. Ma A, Richardson A, Schaefer EM, Parsons JT. Serine phosphorylation of focal adhesion kinase in interphase and mitosis: a possible role in modulating binding to p130(Cas). *Mol Biol Cell.* 2001; 12(1):1-12.
106. Malecki M, Trembacz H, Sroczynska P, Janik P. Signal transduction in adherent and non-adherent human cell lines after fibronectin stimulation. *Oncol Rep.* 2000; 7(1):63-7.
107. Manes S, Mira E, Gomez-Mouton C, Zhao ZJ, Lacalle RA, Martinez-A C. Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(4):3125-35.
108. Matter ML, Ruoslahti E. A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem.* 2001; 276(30):27757-63.
109. Mayer J, Hamel MG, Gottschall PE. Evidence for proteolytic cleavage of brevican by the ADAMTSs in the dentate gyrus after excitotoxic lesion of the mouse entorhinal cortex. *BMC Neurosci.* 2005; 6:52.

110. Meighan SE, Meighan PC, Choudhury P, Davis CJ, Olson ML, Zornes PA, Wright JW, Harding JW. Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity. *J Neurochem.* 2006; 96(5):1227-41.
111. Menon B, Singh M, Ross RS, Johnson JN, Singh K. beta-Adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult cardiac myocytes involves MMP-2-mediated disruption of beta1 integrin signaling and mitochondrial pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 290(1):C254-61.
112. Mohan R, Sivak J, Ashton P, Russo LA, Pham BQ, Kasahara N, Raizman MB, Fini ME. Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *J Biol Chem.* 2000; 275(14):10405-12.
113. Muir EM, Adcock KH, Morgenstern DA, Clayton R, von Stillfried N, Rhodes K, Ellis C, Fawcett JW, Rogers JH. Matrix metalloproteases and their inhibitors are produced by overlapping populations of activated astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002; 100(1-2):103-17.
114. Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998; 18(11):1163-72.
115. Murphy G, Nguyen Q, Cockett MI, Atkinson SJ, Allan JA, Knight CG, Willenbrock F, Docherty AJ. Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J Biol Chem.* 1994; 269(9):6632-6.
116. Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'Shea M, Ward R, Atkinson S, O'Connell J, Docherty A. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 732:31-41.
117. Murtomaki S, Trenkner E, Wright JM, Saksela O, Liesi P. Increased proteolytic activity of the granule neurons may contribute to neuronal death in the weaver mouse cerebellum. *Dev Biol.* 1995; 168(2):635-48.
118. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* 1997; 378:151-160.
119. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274:21491-94.
120. Nagy V, Bozdagi O, Matynia A, Balcerzyk M, Okulski P, Dzwonek J, Costa RM, Silva AJ, Kaczmarek L, Huntley GW. Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J Neurosci.* 2006; 26(7):1923-34.

121. Nakamoto T, Sakai R, Ozawa K, Yazaki Y, Hirai H. Direct binding of C-terminal region of p130Cas to SH2 and SH3 domains of Src kinase. *J Biol Chem.* 1996; 271(15):8959-65.
122. Neumar RW, Meng FH, Mills AM, Xu YA, Zhang C, Welsh FA, Siman R. Calpain activity in the rat brain after transient forebrain ischemia. *Exp Neurol.* 2001;170(1):27-35.
123. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; 33(10):960-70.
124. Novak U, Kaye AH. Extracellular matrix and the brain: components and function. *J Clin Neurosci.* 2000; 7(4):280-90.
125. Oh LY, Larsen PH, Krekoski CA, Edwards DR, Donovan F, Werb Z, Yong VW. Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. *J Neurosci.* 1999; 19(19):8464-75.
126. Ohmori T, Yatomi Y, Inoue K, Satoh K, Ozaki Y. Tyrosine dephosphorylation, but not phosphorylation, of p130Cas is dependent on integrin alpha IIb beta 3-mediated aggregation in platelets: implication of p130Cas involvement in pathways unrelated to cytoskeletal reorganization. *Biochemistry.* 2000; 39(19):5797-807.
127. Ohmori T, Yatomi Y, Okamoto H, Miura Y, Rile G, Satoh K, Ozaki Y. G(i)-mediated Cas tyrosine phosphorylation in vascular endothelial cells stimulated with sphingosine 1-phosphate: possible involvement in cell motility enhancement in cooperation with Rho-mediated pathways. *J Biol Chem.* 2001; 276(7):5274-80.
128. Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S. Intrahippocampal administration of the NO synthase inhibitor L-NAME prevents working memory deficits in rats exposed to transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 1994 Jan 14;634(1):173-7.
129. Owen JD, Ruest PJ, Fry DW, Hanks SK. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(7):4806-18.
130. Pagenstecher A, Stalder AK, Kincaid CL, Shapiro SD, Campbell IL. Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. *Am J Pathol.* 1998; 152(3):729-41.

131. Park SY, Avraham HK, Avraham S RAFTK/Pyk2 activation is mediated by trans-acting autophosphorylation in a Src-independent manner. *J Biol Chem.* 2004; 279(32):33315-22.
132. Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci.* 2003; 116:1409-16.
133. Petch LA, Bockholt SM, Bouton A, Parsons JT, Burridge K. Adhesion-induced tyrosine phosphorylation of the p130 src substrate. *J Cell Sci.* 1995; 108:1371-9.
134. Petittlerc E, Boutaud A, Prestayko A, Xu J, Sado Y, Ninomiya Y, Sarras MP Jr, Hudson BG, Brooks PC. New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Biol Chem.* 2000; 275(11):8051-61.
135. Planas AM, Sole S, Justicia C. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.* 2001; 8(5):834-46.
136. Polte TR, Hanks SK. Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(23):10678-82.
137. Polte TR, Hanks SK. Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs. *J Biol Chem.* 1997; 272(9):5501-9.
138. Pozzi A, Wary KK, Giancotti FG, Gardner HA. Integrin alpha1beta1 mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway in vivo. *J Cell Biol.* 1998; 142(2):587-94.
139. Pulsinelli WA. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res.* 1985; 63:29-37.
140. Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 1982; 11(5):491-8.
141. Pulsinelli WA, Duffy TE. Regional energy balance in rat brain after transient forebrain ischemia. *J Neurochem.* 1983; 40(5):1500-3.
142. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature.* 1992; 356(6368):397-400.

143. Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain.
J Biol Chem. 1992; 267(27):19536-47.
144. Rivera S, Ogier C, Jourquin J, Timsit S, Szklarczyk AW, Miller K, Gearing AJ, Kaczmarek L, Khrestchatisky M. Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia.
Eur J Neurosci. 2002; 15(1):19-32.
145. Roeb E, Schleinkofer K, Kernebeck T, Potsch S, Jansen B, Behrmann I, Matern S, Grotzinger J. The matrix metalloproteinase 9 (mmp-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist.
J Biol Chem. 2002; 277(52):50326-32.
146. Rooprai HK, McCormick D. Proteases and their inhibitors in human brain tumors: a review.
Anticancer Res. 1997; 17:4151-4162
147. Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size.
Stroke. 1998; 29(5):1020-30.
148. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in brain injury.
J Neurotrauma. 1995; 12(5):833-42.
149. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE, Stetler-Stevenson WG. Tumor necrosis factor-alpha-induced gelatinase B causes delayed opening of the blood-brain barrier: an expanded therapeutic window.
Brain Res. 1995; 703(1-2):151-5.
150. Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat.
J Cereb Blood Flow Metab. 1996; 16(3):360-6.
151. Saghatelian AK, Dityatev A, Schmidt S, Schuster T, Bartsch U, Schachner M. Reduced perisomatic inhibition, increased excitatory transmission, and impaired long-term potentiation in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R.
Mol Cell Neurosci. 2001; 17(1):226-40.
152. Saito K, Suyama K, Nishida K, Sei Y, Basile AS. Early increases in TNF-alpha, IL-6 and IL-1 beta levels following transient cerebral ischemia in gerbil brain.
Neurosci Lett. 1996; 206(2-3):149-52.
153. Salazar EP, Rozengurt E. Src family kinases are required for integrin-mediated but not for G protein-coupled receptor stimulation of focal adhesion kinase

autophosphorylation at Tyr-397.
J Biol Chem. 2001; 276(21):17788-95.

154. Sasaki T, Iwata S, Okano HJ, Urasaki Y, Hamada J, Tanaka H, Dang NH, Okano H, Morimoto C. Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated after transient global ischemia in rats: possible involvement of Nedd9 in the differentiation of neurons after ischemia.
Stroke. 2005; 36(11):2457-62.
155. Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89(11):5192-6.
156. Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains.
J Cell Biol. 1995; 130(5):1181-7.
157. Schaller MD, Parsons JT. pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk.
Mol Cell Biol. 1995; 15(5):2635-45.
158. Schaller MD, Sasaki T. Differential signaling by the focal adhesion kinase and cell adhesion kinase beta.
J Biol Chem. 1997; 272(40):25319-25.
159. Schlaepfer DD, Broome MA, Hunter T. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins.
Mol Cell Biol. 1997; 17(3):1702-13.
160. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase.
Nature. 1994; 372(6508):786-91.
161. Schlaepfer DD, Jones KC, Hunter T. Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events.
Mol Cell Biol. 1998; 18(5):2571-85.
162. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase.
Prog Biophys Mol Biol. 1999; 71(3-4):435-78.
163. Schlaepfer DD, Hunter T. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs?
Trends Cell Biol. 1998; 8(4):151-7.
164. Schlaepfer DD, Hunter T. Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through

- interactions with and activation of c-Src.
J Biol Chem. 1997; 272(20):13189-95.
165. Schlaepfer DD, Hunter T. Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases.
Mol Cell Biol. 1996; 16(10):5623-33.
166. Schwartz MA. Integrin signaling revisited.
Trends Cell Biol. 2001; 11(12):466-70.
167. Sharma BK, Kumar K. Role of proinflammatory cytokines in cerebral ischemia: a review.
Metab Brain Dis. 1998; 13(1):1-8.
168. Shipley JM, Doyle GA, Fliszar CJ, Ye QZ, Johnson LL, Shapiro SD, Welgus HG, Senior RM. The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats.
J Biol Chem. 1996; 271(8):4335-41.
169. Sieg DJ, Ilic D, Jones KC, Damsky CH, Hunter T, Schlaepfer DD. Pyk2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pyk2 does not fully function to enhance FAK- cell migration.
EMBO J. 1998; 17(20):5933-47.
170. Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration.
Nat Cell Biol. 2000; 2(5):249-56.
171. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology.
J Neurosurg. 1992; 77(2):169-84.
172. Siesjo BK. A new perspective on ischemic brain damage?
Prog Brain Res. 1993; 96:1-9.
173. Siesjo BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis.
J Cereb Blood Flow Metab. 1989; 9(2):127-40.
174. Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice.
Science. 1992; 257(5067):201-6.
175. Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for

activation.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1990; 87(1):364-8.

176. Steinhilber U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, Huber O. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; 276(7):4972-80.
177. Sternlicht MD, Bergers G. Matrix metalloproteinases as emerging targets in anti-cancer therapy: status and prospects. *Emerging Ther. Targets* 2000; 4:609-633.
178. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17:463-516.
179. Suzuki R, Yamaguchi T, Kirino T, Orzi F, Klatzo I. The effects of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils: I. Blood-brain barrier, cerebral blood flow, and local cerebral glucose utilization changes. *Acta Neuropathol (Berl).* 1983; 60(3-4):207-16.
180. Szaniawska B, Trembacz H, Miloszevska J, Lipkowski AW, Misicka A, Ostrowski J, Janik P. Peptide analog of fibronectin that inhibits cell migration and ERK 1/2 activity. *Peptides.* 2001; 22(12):1949-53.
181. Szklarczyk A, Lapinska J, Rylski M, McKay RD, Kazimarek L. Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J Neurosci.* 2002; 22(3):920-30.
182. Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell.* 2002; 110(5):599-11.
183. Tan K, Nie D, Cai Y, Honn KV. The beta-4 integrin α 5 β 1 rescues A431 cells from apoptosis through a PI3K/Akt kinase signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 264:127-132.
184. Tamura M, Gu J, Danen EH, Takino T, Miyamoto S, Yamada KM. PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem.* 1999; 274(29):20693-703.
185. Taylor JM, Mack CP, Nolan K, Regan CP, Owens GZ, Parsons JT. Selective expression of an endogenous inhibitor of FAK regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biol.* 2001; 21(5):1565-72.

186. Taylor JM, Macklem MM, Parsons JT. Cytoskeletal changes induced by GRAF, the GTPase regulator associated with focal adhesion kinase, are mediated by Rho.
J Cell Sci. 1999; 112 (Pt 2):231-42.
187. Taylor JM, Hildebrand JD, Mack CP, Cox ME, Parsons JT. Characterization of graf, the GTPase-activating protein for rho associated with focal adhesion kinase. Phosphorylation and possible regulation by mitogen-activated protein kinase.
J Biol Chem. 1998; 273(14):8063-70.
188. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1979; 76(9):4350-4.
189. Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland S. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus.
J Neurosci. 1997; 17(2):543-52.
190. Turner CE. Paxillin interactions.
J Cell Sci. 2000; 113:4139-40.
191. Uhm JH, Dooley NP, Oh LY, Yong VW. Oligodendrocytes utilize a matrix metalloproteinase, MMP-9, to extend processes along an astrocyte extracellular matrix.
Glia. 1998; 22(1):53-63.
192. Vecil GG, Larsen PH, Corley SM, Herx LM, Besson A, Goodyer CG, Yong VW. Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo.
J Neurosci Res. 2000; 61(2):212-24.
193. Venstrom KA, Reichardt LF. Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system.
FASEB J. 1993; 7(11):996-1003.
194. Vaillant C, Didier-Bazes M, Hutter A, Belin MF, Thomasset N. Spatiotemporal expressions patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum.
J. Neurosci. 1999; 19:4994-5004.
195. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes Dev. 2000; 14:2123-2133.
196. Vuori K, Hirai H, Aizawa S, Ruoslahti E. Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases.
Mol Cell Biol. 1996; 16(6):2606-13.

197. Vuori K, Ruoslahti E. Association of insulin receptor substrate-1 with integrins. *Science*. 1994; 266(5190):1576-8.
198. Wang FM, Liu HQ, Liu SR, Tang SP, Yang L, Feng GS. SHP-2 promoting migration and metastasis of MCF-7 with loss of E-cadherin, dephosphorylation of FAK and secretion of MMP-9 induced by IL-1beta in vivo and in vitro. *Breast Cancer Res Treat*. 2005; 89(1):5-14.
199. Wang X, Jung J, Asahi M, Chwang W, Russo L, Moskowitz MA, Dixon CE, Fini ME, Lo EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on morphological and motor outcomes after traumatic brain injury. *J Neurosci*. 2000; 20(18):7037-42.
200. Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 1998; 94(5):625-34.
201. Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 1996; 87(4):733-43.
202. Whitney GS, Chan PY, Blake J, Cosand WL, Neubauer MG, Aruffo A, Kanner SB. Human T and B lymphocytes express a structurally conserved focal adhesion kinase, pp125FAK. *DNA Cell Biol*. 1993; 12(9):823-30.
203. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem*. 1989; 264(29):17213-21.
204. Woessner JF, Nagase H. *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. New York: Oxford Univ. Press 2000.
205. Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y. Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family. *J Biol Chem*. 1994; 269(13):10119-26.
206. Yoneda Y, Kuramoto N, Azuma Y, Ogita K, Mitani A, Zhang L, Yanase H, Masuda S, Kataoka K. Possible involvement of activator protein-1 DNA binding in mechanisms underlying ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *Neuroscience* 1998; 86(1):79-97.
207. Yoneda Y, Azuma Y, Inoue K, Ogita K, Mitani A, Zhang L, Masuda S, Higashihara M, Kataoka K. Positive correlation between prolonged potentiation of binding of double-stranded oligonucleotide probe for the transcription factor AP1 and resistance to transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. *Neuroscience* 1997; 79(4):1023-37.

208. Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R, Edwards DR. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci.* 1998; 21(2):75-80.
209. Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2(7):502-11.
210. Yu DH, Qu CK, Henegariu O, Lu X, Feng GS. Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. *J Biol Chem.* 1998; 273(33):21125-31.
211. Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev.* 1999; 13(1):35-48.
212. Zabłocka B, Dłużniewska J, Zając H, Domańska-Janik K. Opposite reaction of ERK and JNK in ischemia vulnerable and resistant regions of hippocampus: involvement of mitochondria. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003;110(2):245-52.
213. Zalewska T, Domańska-Janik K. Brain ischaemia transiently activates Ca²⁺/calmodulin-independent protein kinase II. *Neuroreport.* 1996; 7(2):637-41.
214. Zalewska T, Zabłocka B, Saido TC, Zając H, Domańska-Janik K. Dual response of calpain to rat brain postdecapitative ischemia. *Mol Chem Neuropathol.* 1998; 33(3):185-97.
215. Zalewska T, Ziemka-Nałęcz M, Domańska-Janik K. Transient forebrain ischemia effects interaction of Src, FAK, and PYK2 with the NR2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptor in gerbil hippocampus. *Brain Res.* 2005; 1042(2):214-23.
216. Zhan RZ, Wu C, Fujihara H, Taga K, Qi S, Naito M, Shimoji K. Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome c From mitochondria in a rat forebrain ischemia model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21(5):529-40.
217. Zhang JW, Deb S, Gottschall PE. Regional and differential expression of gelatinases in rat brain after systemic kainic acid or bicuculline administration. *Eur J Neurosci.* 1998; 10(11):3358-68.
218. Zhang Z, Lin SY, Neel BG, Haimovich B. Phosphorylated alpha-actinin and protein-tyrosine phosphatase 1B coregulate the disassembly of the focal adhesion kinase x Src complex and promote cell migration. *J Biol Chem.* 2006; 281(3):1746-54.

219. Zhao H, Ito A, Sakai N, Matsuzawa Y, Yamashita S, Nojima H. RECS1 is a negative regulator of matrix metalloproteinase-9 production and aged RECS1 knockout mice are prone to aortic dilation. *Circ J.* 2006; 70(5):615-24.
220. Zhao BQ, Wang S, Kim HY, Storrie H, Rosen BR, Mooney DJ, Wang X, Lo EH. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med.* 2006a; 12(4):441-5.
221. Ziemka-Nalecz M, Zalewska T, Zajac H, Domanska-Janik K. Decrease of PKC precedes other cellular signs of calpain activation in area CA1 of the hippocampus after transient cerebral ischemia. *Neurochem Int.* 2003; 42(3):205-14.
222. Zong X, Eckert C, Yuan H, Wahl-Schott C, Abicht H, Fang L, Li R, Mistrik P, Gerstner A, Much B, Baumann L, Michalakis S, Zeng R, Chen Z, Biel M. A novel mechanism of modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by Src kinase. *J Biol Chem.* 2005; 280(40):34224-32.