

Autoreferat

Dr Grzegorz A. Czapski

Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego

Polskiej Akademii Nauk

Warszawa, 2014

1. Imię i Nazwisko

Grzegorz Arkadiusz Czapski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- | | |
|------|---|
| 1994 | tytuł magistra biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie;
Praca magisterska „Ekspresja genów <i>nod</i> w zróżnicowanych genetycznie szczepach <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Trifolii</i> ”
wykonana pod kierunkiem dr hab. Mieczysławy Deryło |
| 2005 | stopień doktora nauk medycznych
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie
Praca doktorska „Udział tlenu azotu w uszkodzeniu komórek śródbłonna naczyniowego i mózgu w stresie oksydacyjnym wywołanym lipopolisacharydem”
Promotor – prof. dr hab. Joanna B. Strosznajder |
| 2012 | dyplom ukończenia studiów podyplomowych „Menedżer Badań Naukowych i Prac Rozwojowych”
Wyższa Szkoła Ekonomii i Innowacji w Lublinie |

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych

- | | |
|-----------|--|
| 1999-2006 | Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa (do 2002 roku pod nazwą Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN)
Asystent w Zakładzie Komórkowej Transdukcji Sygnału |
| od 2006 | Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa
Adiunkt w Zakładzie Komórkowej Transdukcji Sygnału |

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Rola kinazy cyklozależnej 5 w molekularnych mechanizmach toksyczności białek o zaburzonej konformacji

4.2. Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

Osiągnięcie stanowi cykl czterech publikacji dotyczących roli kinazy cyklozależnej 5 w mechanizmach toksyczności białek o zaburzonej konformacji w chorobach neurodegeneracyjnych.

Prace oryginalne:

1. Alterations of cyclin dependent kinase 5 expression and phosphorylation in amyloid precursor protein (APP)-transfected PC12 cells.
Czapski GA, Gąssowska M, Songin M, Radecka UD, Strosznajder JB.
FEBS Lett. 2011, 585: 1243-1248
IF 2011: 3,538; KBN/MNiSW: 30
2. A novel mechanism of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) neurotoxicity.
Kaźmierczak A, **Czapski GA**, Adamczyk A, Gajkowska B, Strosznajder JB. Interplay between p53 protein and cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5).
Neurochem Int. 2011, 58: 206-214
IF 2011: 2,857; KBN/MNiSW: 25
3. Extracellular alpha-synuclein induces calpain-dependent overactivation of cyclin-dependent kinase 5 in vitro.
Czapski GA, Gąssowska M, Wilkaniec A, Cieślik M, Adamczyk A.
FEBS Lett. 2013, 587: 3135-41
IF 2012: 3,582; KBN/MNiSW: 30
4. Association between plasma biomarkers, CDK5 polymorphism and the risk of Alzheimer's disease.
Czapski GA, Maruszak A, Styczyńska M, Żekanowski C, Safranow K, Strosznajder JB.
Acta Neurobiol Exp (Wars). 2012, 72: 397-411
IF 2012: 1,977; KBN/MNiSW: 15

Sumaryczny IF wyżej wymienionych prac: 11,954, KBN/MNiSW: 100 pkt.

Opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji znajduje się w Załączniku 4.

Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 9.

4.3 Streszczenia prac

Ad 1

Alterations of cyclin dependent kinase 5 expression and phosphorylation in amyloid precursor protein (APP)-transfected PC12 cells.

Czapski GA, Gąssowska M, Songin M, Radecka UD, Strosznajder JB.

FEBS Lett. 2011, 585: 1243-8.

Jednym z elementów patomechanizmu choroby Alzheimera są zaburzenia procesów fosforylacji i defosforylacji. Celem niniejszej pracy była analiza zmian ekspresji i fosforylacji kinazy cyklinozależnej 5 (Cdk5) w komórkach PC12 stabilnie transfekowanych ludzkim genem dla białka prekursorowego amyloidu (*APP*). Komórki te charakteryzują się zwiększonym poziomem ekspresji białka APP dzikiego typu (*APPwt*) lub *APP* ze szwedzką mutacją (*APPsw*) i w efekcie nagromadzają i uwalniają znaczne ilości peptydów amyloidu β . Wyniki naszych badań wykazały zwiększoną śmiertelność i podwyższony poziom mRNA genu *Cdk5* w komórkach transfekowanych *APP*. Zaobserwowano znaczne obniżenie fosforylacji Cdk5 na Tyr15 w linii *APPsw*, co prowadzi do obniżenia aktywności tej kinazy. Zależna od Cdk5 fosforylacja kinazy syntazy glikogenu 3β (*Gsk-3\beta*) na Ser9 była również obniżona, co może prowadzić do wzrostu aktywności *Gsk-3\beta* i stwierdzonej hiperfosforylacji białka MAP tau. W niniejszej pracy po raz pierwszy zademonstrowano deregulację fosforylacji i aktywności Cdk5 w komórkach transfekowanych *APP*.

Ad 2

A novel mechanism of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) neurotoxicity. Interplay between p53 protein and cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5).

Kaźmierczak A, Czapski GA, Adamczyk A, Gajkowska B, Strosznajder JB.

Neurochem Int. 2011, 58: 206-14.

Peptyd NAC (non-A β component of Alzheimer's disease amyloid) powstaje z białka NACP/ α -synukleina (ASN), jednak mechanizm jego powstawania jest nieznan. Obok amyloidu β , NAC jest stałym składnikiem blaszek starczych w chorobie Alzheimera. Ponadto uważa się, że domena NAC odpowiada za cytotoksyczne właściwości ASN. NAC indukuje stres oksydacyjny/

nitrozacyjny oraz apoptozę i odgrywa istotną rolę w procesach neurodegeneracji. Celem niniejszej pracy była analiza mechanizmów wywołanej przez peptyd NAC śmierci komórek PC12. Egzogenny peptyd NAC indukował zwiększenie ekspresji kinazy cyklozależnej 5 (Cdk5), enzymu o istotnym znaczeniu w fosforylacji i aktywacji p53. Wykazano, że NAC powoduje wzrost ekspresji genów *Cdk5r1* i *Cdk5r2*, kodujących białka p35 i p39, które mają kluczowe znaczenie w regulacji aktywności Cdk5. Inhibitor Cdk5 (BML-259) chronił komórki PC12 przed obumieraniem wywoływanym przez peptyd NAC. Analiza wykonana metodami biologii molekularnej oraz mikroskopii elektronowej transmisyjnej (TEM) wykazała, że egzogenny peptyd NAC wywołuje zaburzenia mitochondriów, nasila produkcję wolnych rodników i powoduje śmierć komórek na drodze apoptozy i autofagii. Badania wykazały zmiany ekspresji oraz translokację pro-apoptotycznego białka Bax. Zaobserwowano także, że NAC powoduje zależne od czasu zwiększenie ekspresji genu *Tp53*. Zmiatacz wolnych rodników N-tert-butylo-alfa-fenylonitron (PBN) i inhibitor p53 (α -pifityryna) chroniły komórki PC12 przed obumieraniem wywoływanym przez peptyd NAC. Uzyskane wyniki wskazują na kluczowe znaczenie aktywacji Cdk5/p53 oraz szlaku apoptozy zależnego od Bax w mechanizmach toksycznego działania peptydu NAC.

Ad 3

Extracellular alpha-synuclein induces calpain-dependent overactivation of cyclin-dependent kinase 5 in vitro.

Czapski GA, Gąssowska M, Wilkaniec A, Cieślik M, Adamczyk A.

FEBS Lett. 2013, 587: 3135-41.

Alfa-synukleina (ASN) uczestniczy w patomechanizmie nie tylko choroby Parkinsona, ale również Alzheimer'a i wielu innych synukleinopatii. ASN działa w przestrzeni wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej. Mechanizm toksyczności zewnątrzkomórkowej ASN nie jest w pełni wyjaśniony. Wcześniejsze badania wykazały, że poprzez zaburzenie homeostazy wapniowej, ASN powoduje aktywację syntazy tlenu azotu i stres oksydacyjny/nitrozacyjny. W niniejszej pracy analizowano rolę kinazy cyklozależnej 5 (Cdk5) w molekularnych mechanizmach toksyczności ASN. Stwierdzono, że zewnątrzkomórkowa ASN powoduje aktywację Cdk5 w komórkach linii PC12. Mechanizm aktywacji Cdk5 był związany z zależną od kalpain proteolizą białka aktywatorowego p35, prowadzącą do powstawania skróconej formy p25,

która jest odpowiedzialna za nadmierną aktywację Cdk5. Zaobserwowano ponadto zwiększenie fosforylacji Cdk5 na Tyr15, co również zwiększa aktywność kinazy. Inhibitory Cdk5 (Roskowitzyna, BML-259) oraz kalpajny (Kalpeptyna) zapobiegały obumieraniu komórek wywołanemu przez ASN. Uzyskane wyniki, wskazując na udział Cdk5 w toksyczności ASN, dostarczyły nowych informacji na temat mechanizmu, poprzez który zewnątrzkomórkowa ASN może powodować śmierć komórek dopaminergicznych.

Ad 4

Association between plasma biomarkers, *CDK5* polymorphism and the risk of Alzheimer's disease.

Czapski GA, Maruszak A, Styczyńska M, Żekanowski C, Safranow K, Strosznajder JB.
Acta Neurobiol Exp (Wars). 2012, 72: 397-411.

Kinaza cyklinozależna 5 (Cdk5) jest ważnym elementem patomechanizmu choroby Alzheimera (AD). Istniejące dane literaturowe sugerują, że zmienność genetyczna w obrębie genu *CDK5* może mieć wpływ na ryzyko rozwoju tej choroby. Celem niniejszej pracy było zbadanie, czy istnieje związek pomiędzy polimorfizmem genu *CDK5* a ryzykiem AD oraz parametrami biochemicznymi osocza krwi w populacji polskiej. Analizie poddano polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP): rs2069454 (G>C), rs2069442 (C>G) i rs9278 (G>A). Przebadano DNA 71 chorych z AD o wczesnym początku (EOAD), 204 pacjentów z AD o późnym początku (LOAD) i 178 osób zdrowych. Stwierdzono, że nie ma związku pomiędzy badanymi SNP i ryzykiem AD w populacji polskiej. Wykonano meta-analizę uprzednio opublikowanych danych i danych bieżących, z której wynika, że polimorfizm rs2069454 może mieć związek z ryzykiem zachorowania na chorobę Alzheimera. Zaobserwowano u osób cierpiących na AD podwyższone stężenie całkowitego cholesterolu, frakcji LDL i homocysteiny, oraz obniżone stężenie frakcji HDL i witaminy B12. Analizowane miejsca polimorficzne w genie *CDK5* nie wykazywały związku z poziomem parametrów biochemicznych. Nasze badania wykazały, że zmiany poziomu cholesterolu, LDL, HDL, homocysteiny i B12 mogą mieć istotne znaczenie w patomechanizmie AD.

4.4 Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Rola kinazy cyklinozależnej 5 w molekularnych mechanizmach toksyczności białek o zaburzonej konformacji

Wstęp

Wraz ze wzrostem odsetka ludzi starych w społeczeństwie rośnie znaczenie chorób neurodegeneracyjnych. Dotychczasowe badania prowadzone nad patomechanizmem chorób neurodegeneracyjnych, chociaż nie dostarczyły satysfakcjonujących i efektywnych metod leczenia, udowodniły, że w przebiegu tych chorób dochodzi do zaburzenia funkcjonowania licznych procesów molekularnych. Wspólną cechą wielu chorób neurodegeneracyjnych, nazywanych również konformacyjnymi, są zaburzenia dotyczące konformacji specyficznych białek (ang. protein misfolding) prowadzące do ich gromadzenia w układzie nerwowym w formie nierozpuszczalnych złogów. Białka te nie mają wspólnej sekwencji ani podobnej struktury, są jednak przyczyną analogicznych zmian w układzie nerwowym, prowadzących w efekcie do zaburzenia funkcji neuronów, ich obumierania, i w konsekwencji do nieodwracalnych zmian funkcjonowania układu nerwowego. Największe znaczenie, ze względu na duży odsetek chorych cierpiących z powodu choroby Alzheimera (AD) lub Parkinsona (PD), mają peptydy amyloidu- β ($A\beta$), MAP tau i α -synukleina (ASN), ale białek tego typu jest więcej, np. huntingtyna, dysmutaza ponadtlenkowa 1 (ang. sodium superoxide dismutase 1), TDP-43 (ang. TAR DNA-binding protein 43), białko FUS (ang. fused in sarcoma).

Potranslacyjne modyfikacje białek mają zasadniczy wpływ na ich funkcje. Najważniejsze są fosforylacja i defosforylacja. O ogromnym znaczeniu tych mechanizmów niech świadczy fakt, że w ludzkim genomie zidentyfikowano geny dla ponad 500 kinaz, a ogromna ilość białek (ponad 1/3) podlega fosforylacji/defosforylacji. Zaburzenia regulacji tych procesów prowadzą do poważnych zaburzeń w funkcjonowaniu komórki, co zostało potwierdzone dla ponad 400 różnych chorób człowieka. Należą również do nich choroby ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Zaburzenia procesów fosforylacji i defosforylacji mają miejsce tak w ostrych, jak i przewlekłych stanach chorobowych. Stwierdzono, że zarówno po urazowym uszkodzeniu mózgu, jak i w warunkach udaru niedokrwienego lub

krwotocznego, dochodzi do zmian w aktywności kinaz, co poważnie wpływa na dynamikę procesów patologicznych prowadzących do neurodegeneracji. Zaburzenia fosforylacji i defosforylacji odgrywają również istotną rolę w patomechanizmie przewlekłych chorób neurodegeneracyjnych. Spośród wielu kinaz, które uczestniczą w patomechanizmie chorób neurodegeneracyjnych, coraz większe zainteresowanie zyskuje kinaza cyklinozależna 5 (Cdk5).

Kinaza cyklinozależna 5 – mechanizmy regulacji i funkcje

Kinaza cyklinozależna 5 (Cdk5; EC 2.7.11.22) należy do grupy kinaz serynowo-treoninowych i została, po odkryciu w 1992 roku, zaklasyfikowana do rodziny kinaz cyklinozależnych (CDK). Z powodu braku wyraźnej funkcji związanej z regulacją cyklu komórkowego oraz ze względu na fakt, że do aktywacji wymagała specyficznych aktywatorów białkowych spoza rodziny cyklin, została nazwana nietypową kinazą CDK. Uważa się, że kinaza Cdk5 najwyższą aktywność osiąga w neuronach.

Kinaza Cdk5 wymaga do aktywacji utworzenia kompleksu z jednym z dwóch białek aktywatorowych, p35 lub p39. Ekspresja kinazy Cdk5 ma miejsce w wielu typach komórek i tkanek, natomiast ekspresja białek p35 i p39 osiąga wysoki poziom w układzie nerwowym. Funkcje obu białek częściowo się pokrywają. Jak wykazały badania na myszach, o ile delecja genu *Cdk5*, podobnie jak delecja obu genów *Cdk5r1* (p35) i *Cdk5r2* (p39), powoduje poważne zaburzenia rozwoju OUN wywołujące śmierć w okresie okołoporodowym, myszy pozbawione pojedynczego genu p35 lub p39 przeżywają. Delecja p35 nie jest letalna, ale powoduje zaburzenia uwarstwienia struktur mózgowych i zwiększa podatność na napady padaczkowe o zwiększonej śmiertelności. Delecja p39 nie powoduje żadnych poważnych zaburzeń [Ohshima i wsp. 1996; Chae i wsp. 1997; Ko i wsp. 2001]. Białka te mają stosunkowo krótki czas półtrwania (np. dla p35 wynosi on 20-30 min *in vivo*) i są szybko degradowane w proteasomie [Patrick i wsp., 1998]. Zarówno p35, jak i p39, posiadają na N-końcu miejsce mirystylacji (Gly2) jak również klaster lizynowy (aminokwasy 61-67 w p35 i 75-85 w p39), co determinuje lokalizację aktywnego kompleksu Cdk5-p35 w cytoplazmie w przestrzeni okołojądrowej i lokalizację kompleksu Cdk5-p39 w błonie plazmatycznej [Asada i wsp., 2008]. Pomimo braku sekwencji NLS (ang. nuclear localization sequence) Cdk5 znajduje się również w jądrze komórkowym. Jest to możliwe dzięki bezpośredniej interakcji typu białko-białko z inhibitorem CDK – p27 [Zhang i wsp., 2010].

Dodatkowym mechanizmem regulacji aktywności kompleksu Cdk5-p35/p39 jest fosforylacja. Kinaza Cdk5 ma w swojej strukturze kilka miejsc fosforylacji, z czego co najmniej 3 mają wpływ na jej aktywność: Thr14, Tyr15 i Ser 159. Wpływ fosforylacji Thr14 nie został dostatecznie wyjaśniony, wiadomo natomiast, że fosforylacja Tyr15 i Ser159 zwiększa aktywność Cdk5 [Hisanaga i Ishiguro, 2008]. Również białka p35 i p39 podlegają regulacji na drodze fosforylacji. Fosforylacja Ser8 w p35 lub p39 może zmienić lokalizację kompleksu z błonowej na cytoplazmatyczną [Asada i wsp., 2012]. Zaobserwowano również, że status fosforylacji Thr84 p39 ma wpływ na jądrową lokalizację kompleksu. Ponieważ zarówno Ser8 jak i Thr84 mogą być fosforylowane przez Cdk5, mamy tu do czynienia z mechanizmem autoregulacji Cdk5. Podobne znaczenie ma fosforylacja Thr138, również katalizowana przez Cdk5, która skraca czas półtrwania p35, prawdopodobnie poprzez przyspieszenie degradacji w proteasomie. Najnowsze badania wskazują, że na aktywność Cdk5 wpływ ma również S-nitrozylacja cysteiny w pozycjach 83 i 157. Wyniki badań są jednak sprzeczne i nie pozwalają na określenie, czy S-nitrozylacja hamuje, czy zwiększa aktywność Cdk5 [Zhang i wsp. 2010; Qu i wsp., 2011].

Kinaza Cdk5 jest ważnym komponentem wielu szlaków sygnalizacyjnych w komórce [Lalioi i wsp., 2010; Chueng i Ip, 2012]. Bierze udział w regulacji rozwoju OUN, ma wpływ na migrację i różnicowanie neuronów oraz na synaptogenezę. Uczestniczy w kontroli neurogenezy również w dojrzałym mózgu [Jessberger i wsp., 2009]. Ważna jest również rola Cdk5 w regulacji neuroprzeżywalności, transportu aksonalnego i szlaków odpowiedzialnych za śmierć lub przeżycie komórki, m.in. apoptozy i autofagii. Istotna funkcja Cdk5 wiąże się z jej jądrową lokalizacją [Zhang i wsp., 2011]. Cdk5, przez tworzenie kompleksu z białkami p27 i E2F1 powoduje blokadę cyklu komórkowego w postmitotycznych neuronach. Blokowanie cyklu komórkowego przez Cdk5 nie wymaga aktywności tej kinazy, ponieważ roskowityna, będąca inhibitorem Cdk5, nie ma wpływu na to zjawisko. Anomalie wskazujące na reaktywację mechanizmów cyklu komórkowego w dojrzałych neuronach są obserwowane w wielu chorobach OUN [Żekanowski i Wojda, 2009]. Nadmierna lub zbyt mała aktywność Cdk5 ma negatywny wpływ na funkcjonowanie komórki. Główny mechanizm odpowiedzialny za nadmierną aktywację Cdk5, którego istnienie potwierdzono w wielu schorzeniach, polega na katalizowanej przez kalpajny proteolizie białek aktywatorowych p35 i p39. Wzrost stężenia wapnia w cytoplazmie indukuje wapniowo-zależne proteazy – kalpajny, których aktywność powoduje cięcie białek p35 i p39, odpowiednio w pozycjach 98/99 i 99/100. Powstające

krótsze peptydy p25 i p29 pozbawione są N-końcowego fragmentu wielkości około 10 kDa, który determinuje ich lokalizację w komórce. Peptydy p25 i p29 zachowują zdolność tworzenia kompleksu i aktywacji Cdk5. Zaobserwowano, że ze względu na większą stabilność, p25 i p29 są silniejszymi aktywatorami Cdk5 niż p35 i p39. Ten mechanizm odpowiedzialny jest za wzrost aktywności Cdk5 i za zmianę jej lokalizacji w komórce, co może prowadzić do nieprawidłowej fosforylacji substratów Cdk5.

Cel podjętych badań

Znaczenie kinazy cyklinozależnej 5 (Cdk5) w molekularnych mechanizmach cytotoksyczności peptydów amyloidu- β (A β), α -synukleiny (ASN) oraz peptydu NAC nie jest w pełni wyjaśnione.

Celem podjętych badań było:

1. Zbadanie udziału kinazy Cdk5 w mechanizmach toksyczności amyloidu- β w modelu komórkowej nadekspresji APP;
2. Wyjaśnienie roli Cdk5 w mechanizmach cytotoksyczności peptydu NAC, będącego fragmentem ASN;
3. Zbadanie udziału Cdk5 w mechanizmie śmierci komórek wywołanej przez działającą zewnątrzkomórkowo ASN;
4. Przeanalizowanie związku polimorfizmu genu *CDK5* z ryzykiem choroby Alzheimera w polskiej populacji i wykonanie meta-analizy dostępnych danych.

Rola Cdk5 w mechanizmach toksyczności amyloidu- β

Amyloid-beta (A β) od lat pozostaje w centrum badań nad patomechanizmem choroby Alzheimera (AD). Teoria amyloidowa zaproponowana przed laty do dziś znajduje się w głównym nurcie badań, choć próby opracowania w oparciu o nią metody terapeutycznej nie przyniosły satysfakcjonujących wyników [Hardy i Higgins, 1992; Hardy i Selkoe, 2002; Karran i wsp., 2011]. Mimo tego, że badania eksperymentalne i genetyczne potwierdziły kluczową rolę zaburzeń amyloidogenezy w chorobie Alzheimera, teoria amyloidowa miała wielu krytyków, głównie z powodu braku korelacji pomiędzy nasileniem zaburzeń poznawczych i ilością płytek starczych w mózgu. Obecnie uważa się, że nie agregaty amyloidu

w płytkach starczych, ale rozpuszczalne oligomery A β (głównie dimery, trimery i A β *56) są odpowiedzialne za neurodegenerację i zaburzenia poznawcze [Larson i Lesne, 2012].

Obok nagromadzenia płytek starczych w mózgu, drugim neuropatologicznym wyznacznikiem choroby Alzheimera jest obecność w neuronach splątków neurofibrylarnych, których głównym składnikiem jest hiperfosforylowane białko MAP tau. Stopień zaburzeń poznawczych dobrze koreluje z nasileniem zwyrodnienia włókienkowego. Teoria dominującej roli tau zakłada, że to zaburzenia dotyczące białka tau są najważniejszym elementem etiologii choroby Alzheimera [Giacobini i Gold, 2013]. Literatura naukowa dostarcza dowodów potwierdzających obie koncepcje. Stworzona niedawno teoria „podwójnej ścieżki” (ang. dual pathway hypothesis) zakłada, że zaburzenia zarówno amyloidogenezy jak i hiperfosforylacja białka tau, są zmianami wtórnymi spowodowanymi przez inny, nadrzędny czynnik [Small i Duff, 2008]. Sugeruje się, że mogą to być m.in. zaburzenia homeostazy wapniowej, stres oksydacyjny, Gsk-3 β [Proctor and Gray, 2012]. Dane literaturowe wskazują, że kinaza Cdk5, która znajduje się w centrum zaburzeń związanych z AD, jest ważnym elementem patomechanizmu tej choroby.

Pierwsze sugestie o możliwym udziale Cdk5 w patomechanizmie AD pojawiły się w pracy Baumanna i wsp. [1993], którzy zasugerowali, że Cdk5 należy, obok Gsk-3 i MAPK, do grupy kinaz odpowiedzialnych za zwiększoną fosforylację białka tau w AD. O istotnej roli tej kinazy w AD świadczyła też akumulacja p25 w mózgach chorych, która miała być odpowiedzialna na wzrost aktywności Cdk5 [Patrick i wsp., 1999]. Chociaż niektórzy badacze zakwestionowali te obserwacje, sugerując, że konwersja p35 do p25 jest niespecyficzna i wynika ze zbyt długiego czasu pozyskiwania próbki, większość potwierdziła wzrost poziomu p25 w mózgu w przebiegu AD [Taniguchi i wsp., 2001; Takashima i wsp., 2001, Tseng i wsp., 2002; Sadleir i Vassar, 2012]. W mózgach osób chorych zwiększa się także S-nitrozylacja Cdk5, co może wskazywać na zwiększoną aktywność tej kinazy [Qu i wsp., 2011]. Zaobserwowano również obecność Cdk5 w splątkach neurofibrylarnych (ang. neurofibrillary tangles; NFT) i zasugerowano, że aktywacja Cdk5 ma miejsce na wczesnych etapach ich powstawania i jest czynnikiem przyspieszającym ich formowanie [Takahashi i wsp., 2000]. O istotnym znaczeniu Cdk5 w etiologii AD świadczy również fakt, że poziom tej kinazy jest podwyższony w hipokampie pacjentów z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (ang. mild cognitive impairment; MCI) [Sultana i Butterfield, 2007].

Również badania eksperymentalne w modelach *in vitro* i *in vivo* potwierdziły, że A β może indukować wzrost aktywności Cdk5 poprzez zależną od wapnia i kalpain proteolizę p35, ale także na drodze S-nitrozylacji [Lee i wsp., 2000; Town i wsp., 2002; Lopes i wsp., 2007, 2010; Medeiros i wsp., 2012; Shukla i wsp., 2013; Qu i wsp., 2011]. W badaniach eksperymentalnych wykazano także, że farmakologiczna lub genetyczna inhibicja Cdk5 jest skuteczną metodą hamowania skutków neurotoksycznego działania A β , co potwierdza kluczową rolę Cdk5 w patomechanizmie AD [Lopes i wsp., 2007, 2010; Crews i wsp., 2011; Shukla i wsp., 2013].

Hiperfosforylacja białka tau związanego z mikrotubulami (ang. microtubule associated protein tau; MAP tau) zalicza się do najważniejszych konsekwencji nadmiernie zwiększonej aktywności Cdk5. Najdłuższa z sześciu izoform MAP tau u człowieka, tau₄₄₁, ma ponad 45 potwierdzonych miejsc fosforylacji, z których wiele przypisać można Cdk5 [Noble i wsp., 2013]. W stanie hiperfosforylacji tau nie może się wiązać z tubuliną, co ogranicza jego rolę stabilizatora mikrotubul i negatywnie wpływa na działanie cytoszkieletu, transportu aksonalnego i całego neuronu. Ponadto, hiperfosforylowane białko MAP tau oligomeryzuje, tworząc tzw. sparowane, spiralne filamenty (ang. paired helical filaments; PHF), których wewnątrzkomórkowe złożki, w postaci NFT, są elementem tauopatii. Rola tau nie ogranicza się tylko do zaburzeń funkcji cytoszkieletu [Morris i wsp., 2011; Reddy i wsp., 2011; Noble i wsp., 2013]. Niekorzystne efekty hiperfosforylacji tau mogą być również związane z utratą homeostatycznych funkcji tego białka. Jak wykazali Lei i wsp. [2012], niedobór rozpuszczalnej formy tau prowadzi do zależnej od APP akumulacji żelaza w neuronach. Białko tau może również chronić jądro DNA przed uszkodzeniami [Sultan i wsp., 2011]. Badania ostatnich lat sugerują, że tau w formie monomerycznej lub zagregowanej może działać neurotoksycznie również jako czynnik zewnątrzkomórkowy [Gomez-Ramos i wsp., 2006; Clavaguera i wsp., 2009; Gendreau i Hall, 2013].

Istotną rolę Cdk5, jako tau-kinazy, w patomechanizmie AD potwierdziły badania eksperymentalne. W mózgach myszy transgenicznym zwiększona ekspresja białka p25 i aktywność Cdk5 korelowały z podwyższonym poziomem fosforylacji tau [Ahlijanian i wsp., 2000]. Konsekwencją hiperfosforylacji tau była zmiana jego lokalizacji w komórce, destabilizacja mikrotubul i zaburzenia cytoszkieletu. W hodowli pierwotnej neuronów szczura inhibitor Cdk5, butyrolakton, powstrzymywał wywołaną przez A β fosforylację (Ser202/Thr205) białka tau i zmianę jego lokalizacji w komórce [Alvarez i wsp., 2001]. Także

w pracy Lopes i wsp. [2007] wykazano, że inhibicja kalpain (MDL28170) albo Cdk5 (roskowityna) zapobiega zależnej od Cdk5 fosforylacji białka tau na Ser202/Thr205. Aby uniknąć ograniczeń związanych ze stosowaniem inhibitorów, wykonano również badania z wykorzystaniem genetycznych metod inhibicji Cdk5. Wyciszając gen *Cdk5* metodą interferencji RNA, Piedrahita i wsp. [2010] wykazali udział tej kinazy w hiperfosforylacji tau u myszy 3xTg-AD. Ekspresja peptydu p5, będącego specyficznym inhibitorem kompleksu Cdk5-p25, zapobiegała wywołanej przez A β aktywacji Cdk5 i fosforylacji białka tau w pierwotnej hodowli neuronów szczura [Zheng i wsp., 2010]. Dowiedziono również, że w hipokampie i korze mózgu myszy APP^{swe}/PSEN1 Δ E9 zależny od kinazy tyrozynowej c-Abl wzrost fosforylacji (Tyr15) i aktywności Cdk5 przyczynia się do zwiększonej fosforylacji MAP tau [Cancino i wsp., 2011]. Wzrost aktywności Cdk5 może wpływać na fosforylację białka tau również w sposób pośredni. Zależna od Cdk5 fosforylacja fosfatazy PP1 α na Thr320 obniża jej aktywność i tym samym przyczynia się do wzrostu fosforylacji tau [Lu i wsp., 2011]. Ważną rolę w regulacji fosforylacji tau odgrywa również zjawisko interakcji pomiędzy Cdk5 i kinazą syntazy glikogenu 3 β (ang. glycogen synthase kinase 3 β ; Gsk-3 β) [Engmann i Giese, 2009]. Katalizowana przez Cdk5 fosforylacja tau zwiększa podatność tego białka na późniejszą fosforylację katalizowaną przez Gsk-3 β [Sengupta i wsp., 1997]. Istnieje jednak ujemna korelacja pomiędzy aktywnością Cdk5 i Gsk-3 β , zwiększona aktywność Cdk5 przyczynia się do obniżenia aktywności Gsk-3 β poprzez fosforylację Ser9, która ma kluczowe znaczenie dla regulacji aktywności Gsk-3 β [Morfini i wsp., 2004]. Nie jest to jednak prawdopodobnie bezpośredni efekt działania Cdk5, ale skutek fosforylacji i zahamowania PP1 lub aktywacji szlaku szlaku ErbB - PI3K/Akt przez Cdk5 [Morfini i wsp., 2004; Wen i wsp., 2008].

Kinaza Cdk5 może również wpływać na proces amyloidogenezy. Badania wykonane na myszach transgenicznym wykazały, że podwyższona ekspresja p25 w przodomózgowiu powoduje już po 2-3 tygodniach wzrost poziomu endogenego A β w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Taki sam efekt p25 obserwowano również u myszy transgenicznym cechujących się ekspresją ludzkiego genu *APP* [Cruz i wsp., 2006]. Zasugerowano, że za akumulację A β odpowiedzialny jest, spowodowany przez Cdk5-p25, wzrost ekspresji i aktywności BACE1, zwiększona fosforylacja APP na Thr668 oraz zaburzenia transportu aksonalnego [Cruz i wsp., 2003; Lee i wsp., 2003; Stokin i wsp., 2005; Wen i wsp., 2008; Giusti-Rodriguez i wsp., 2011]. Wzrost ekspresji BACE1 spowodowany był przez zwiększoną aktywność czynnika transkrypcyjnego STAT3 wskutek katalizowanej przez Cdk5 fosforylacji

na Ser 727. Odmienne wyniki otrzymano w eksperymentach *in vitro* z wykorzystaniem hodowli pierwotnej mysich neuronów. Inkubacja w obecności oligomerów $A\beta_{1-42}$ powodowała wprawdzie wzrost poziomu zarówno p25/p35 jak i BACE1, ale inhibitory Cdk5 (roskowitzyna i CP681301) nie tylko nie zapobiegały wzrostowi poziomu BACE1, ale go zwiększały na poziomie post-transkrypcyjnym [Sadleir i wsp., 2012]. Równocześnie zaobserwowano obniżenie fosforylacji APP na Thr668 pod wpływem inhibitorów Cdk5. Wyjaśnienie przyczyn przedstawionych tu różnic i rzeczywistej roli Cdk5 w regulacji BACE1 wymaga dalszych badań. Regulacja ekspresji BACE1 wydaje się być interesującą strategią terapeutyczną wpływającą na przebieg choroby. Wzrost aktywności BACE1, będący skutkiem mutacji szwedzkiej APP jest wystarczającym warunkiem wystąpienia rodzinnej formy AD [Citron i wsp., 1992]. Kilkukrotny wzrost poziomu białka BACE1, w porównaniu do grupy kontrolnej, wykryto również w korze mózgu u osób cierpiących na późną postać AD [Holsinger i wsp., 2002]. Za wzrost ten prawdopodobnie odpowiedzialne są zmiany na poziomie potranslacyjnym, ponieważ poziom mRNA BACE1 nie zwiększa się w AD [Holsinger i wsp., 2002; Preece i wsp., 2003].

Udział kinazy Cdk5 w patomechanizmie choroby Alzheimera nie ogranicza się do fosforylacji APP i tau. Niektóre niekorzystne efekty deregulacji Cdk5 wiążą się z jej wielokierunkowym udziałem w kontrolowaniu funkcji synaps, która jest poważnie zaburzona w AD. Cdk5 może wpływać na wielkość i morfologię synaps, syntezę neuroprzekaźników, ilość i aktywność receptorów [Lai i Ip, 2009; Lalioti i wsp., 2010; Lopes i Agosthino, 2011]. Do substratów Cdk5 zalicza się kilka białek rusztowania gęstości postsynaptycznej (ang. postsynaptic density; PSD), np. PSD95 i GKAP. Wyniki badań prowadzonych na hodowli pierwotnej neuronów szczura sugerują, że aktywacja Cdk5 wywołana przez oligomery $A\beta_{1-40}$, jest odpowiedzialna za degradację GKAP, co prowadzi do dysocjacji połączeń pomiędzy białkami PSD [Roselli i wsp., 2011]. W hodowli mieszanej komórek nerwowych i glejowych szczura wykazano, że w mechanizmie utraty kolców dendrytycznych wywołanej przez oligomery $A\beta_{1-42}$, kluczową rolę wydaje się odgrywać S-nitrozylacja, zwiększająca aktywność Cdk5 [Qu i wsp., 2011]. W hodowli neuronów szczura oligomery $A\beta$ zaburzają równowagę pomiędzy aktywnymi (ang. recycling) i nieczynnymi (ang. resting) pęcherzykami synaptycznymi poprzez mechanizm zależny od kalpain i Cdk5 [Park i wsp., 2013].

Badania prowadzone przeze mnie wykonane były na linii szczurzych komórek chromochłonnych (pheochromocytoma) rdzenia nadnerczy PC12. Dzięki temu, że komórki

chromafinowe rdzenia nadnerczy wywodzą się z neuroektodermy (a dokładnie z grzebienia nerwowego) i w obecności czynników neurotroficznych (np. NGF lub BDNF) różnicują się w kierunku komórek nerwowych, od lat są stosowane w badaniach nad procesami różnicowania i nad mechanizmami neurodegeneracji [Greene i Tischler, 1976; Murayama i wsp., 2001]. Model ten jest uznany za odpowiedni do badania zmian molekularnych wywołanych przez peptydy o zaburzonej konformacji.

Wyjaśnienie roli Cdk5 w mechanizmach toksyczności amyloidu- β było celem pracy pt. „Alterations of cyclin dependent kinase 5 expression and phosphorylation in amyloid precursor protein (APP)-transfected PC12 cells” (Czapski i wsp., 2011; FEBS Lett., 585: 1243-1248). W badaniach wykorzystano genetycznie modyfikowane linie komórek PC12 cechujące się trwałą produkcją i sekrecją amyloidu β [Eckert i wsp., 2001; Leutz i wsp., 2001]. Linia APPwt została stabilnie transfekowana ludzkim genem *APP* typu dzikiego (ang. wild type), natomiast linia APPsw ludzkim genem *APP* posiadającym podwójną mutację typu szwedzkiego (KM670/671NL), w której, w efekcie podstawienia G>T i A>C, dochodzi do zastąpienia kodonów AAG.ATG przez AAT.CTG i w efekcie do zmiany aminokwasów w łańcuchu białkowym: lizyny (K) i metioniny (M) na asparaginę (N) i lizynę (L). Ponieważ zmiana ta ma miejsce w rejonie cięcia APP przez beta-sekretazę, jej skutkiem jest zwiększona produkcja i sekrecja amyloidu- β [Haas i wsp., 1995; Chalimoniuk i wsp., 2007]. Jako kontroli używano linii stabilnie transfekowanej pustym wektorem. Zaobserwowano, że zwiększony poziom produkcji A β w liniach APPwt i APPsw koreluje ze zwiększonym obumieraniem komórek w tych liniach. Wcześniejsze doniesienia literaturowe sugerowały, że jednym z mechanizmów neurotoksycznego działania A β jest zwiększenie aktywności Cdk5 [Alvarez i wsp., 1999; Town i wsp., 2002; Roselli w wsp., 2011]. Jednak w przypadku komórek stabilnie transfekowanych genem *APP* zaobserwowano odmienny mechanizm działania Cdk5. Inhibitory Cdk5, roskowityna i BML-259, nie miały wpływu na obumieranie komórek wywołane przez zwiększoną ekspresję APP, co potwierdzono badając żywotność komórek testem MTT i obumieranie komórek testem LDH. Te wyniki zasugerowały, że w tym modelu eksperymentalnym nie dochodzi do znaczącego zwiększenia aktywności Cdk5. Potwierdzono to badając ekspresję Cdk5, p35 i p39. Wprawdzie poziom mRNA dla genu *Cdk5* był nieznacznie podwyższony w linii APPsw, ale ekspresja aktywatorów *Cdk5r1* i *Cdk5r2* nie zmieniała się. Analiza Western blotting wykazała, że poziom białka Cdk5, p35 i p39 nie zmieniał się w komórkach linii APPwt i APPsw, co wskazuje, że zmiany poziomu białka nie

mogą być przyczyną wzrostu aktywności Cdk5. Nie stwierdzono również obecności białka p25, z czego wynika, że w komórkach transfekowanych genem *APP* nie dochodzi do aktywacji kalpain i proteolitycznego cięcia p35 prowadzącego do powstania p25. Analiza wykazała jednak zmiany poziomu fosforylacji Cdk5. Zaobserwowano znaczny spadek fosforylacji Tyr 15, co może przyczyniać się do zmniejszenia aktywności katalitycznej tej kinazy w komórkach transfekowanych *APP*. Jednym z udokumentowanych efektów zmiany aktywności Cdk5 jest zmiana poziomu fosforylacji seryny 9 Gsk-3 β [Morfini i wsp., 2004; Wen i wsp., 2008]. Nie jest to prawdopodobnie efekt bezpośredniej fosforylacji Gsk-3 β przez Cdk5, ale rezultat działania Cdk5 na fosfatazę białkową 1 (PP1), główną fosfatazę serynowo-treoninową w mózgu [Coen i wsp., 2002]. Ponieważ fosforylacja PP1 na Thr320 powoduje inhibicję tej fosfatazy, zmniejszenie aktywności Cdk5 prowadzi do obniżenia fosforylacji PP1 i tym samym powoduje wzrost aktywności PP1 [Li i wsp., 2007]. Skutkiem jest nasilona defosforylacja substratów PP1, wśród których jest również Gsk-3 β . W efekcie dochodzi do obniżenia fosforylacji Ser9 w Gsk-3 β , co powoduje znaczny wzrost aktywności tej kinazy. Badania wykonane w celu weryfikacji, czy obniżenie aktywności Cdk5 w komórkach transfekowanych *APP* powoduje zmiany fosforylacji (i tym samym aktywności) Gsk-3 β , wykazały znaczne obniżenie fosforylacji seryny 9 przy braku zmian poziomu białka Gsk-3 β . Następnym krokiem było sprawdzenie, czy ta modyfikacja w przewidywany sposób wpływa na aktywność Gsk-3 β . Aktywność tej kinazy oceniano poprzez pomiar poziomu fosforylacji jednego z jej najistotniejszych substratów. Analiza wykazała, że w komórkach transfekowanych genem *APP* dochodzi do wzrostu fosforylacji seryny 396 w białku MAP tau, co potwierdza podwyższoną aktywność Gsk-3 β . Uzyskane wyniki pokazały zależny od Cdk5 mechanizm prowadzący do hiperfosforylacji białka tau w komórkach stabilnie transfekowanych genem *APP* i produkujących podwyższone ilości A β . Wykazaliśmy, że nie tylko podwyższenie, ale również obniżenie aktywności Cdk5 może mieć negatywne konsekwencje. Ponadto, dowiedliśmy jak ważne w mechanizmach toksyczności A β są interakcje pomiędzy Cdk5 i Gsk-3 β .

Rola Cdk5 w mechanizmach toksyczności alfa-synukleiny

Chociaż obecnie uważa się, że zaburzenia alfa-synukleiny mają miejsce w różnych chorobach neurodegeneracyjnych, największe znaczenie, ze względu na dużą liczbę chorych, ma udział tego białka w patomechanizmach choroby Parkinsona (PD) i w chorobie

Alzheimera z ciałami Lewy'ego. Pierwsze doniesienia wskazujące na możliwy udział kinazy Cdk5 w patomechanizmie PD odnosiły się do obecności Cdk5 w ciałach Lewy'ego. W analizie immunohistochemicznej stwierdzono, że ciała Lewy'ego zlokalizowane w istocie czarnej i miejscu sinawym wykazują immunoreaktywność anty-Cdk5 i anty-p35, co sugeruje, że obecna w ciałach Lewy'ego Cdk5 może wykazywać aktywność enzymatyczną [Brion i Couck, 1995; Nakamura i wsp., 1997; Takahashi i wsp., 2000]. Ponadto stwierdzono, że w mózgu osób chorych dochodzi do aktywacji kalpain, proteolizy p35 prowadzącej do powstania p25 i do wzrostu aktywności Cdk5 [Crocker i wsp., 2003; Alvira i wsp., 2008].

Również zwierzęce modele eksperymentalne dostarczyły danych potwierdzających znaczenie Cdk5 w PD. W modelu MPTP (1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny) odnotowano wzrost ekspresji i aktywności Cdk5 w neuronach dopaminergicznych istoty czarnej u myszy [Smith i wsp. 2003]. Zaobserwowano również wzrost poziomu p25, co dobrze koresponduje z podwyższoną aktywnością kalpain w tym modelu eksperymentalnym [Smith i wsp., 2006]. Zahamowanie kalpain lub Cdk5 zapobiegało degeneracji neuronów dopaminergicznych istoty czarnej i zmniejszało zaburzenia funkcjonalne [Crocker i wsp., 2003; Smith i wsp., 2003]. Również w szczurzym modelu PD polegającym na iniekcji 6-hydroksydopaminy (6-OHDA) do istoty czarnej zaobserwowano wzrost ekspresji Cdk5 i p35 w apoptotycznych neuronach [Neystat i wsp., 2001].

Badania eksperymentalne *in vitro* także potwierdziły zmiany ekspresji i aktywności Cdk5/p25 w komórkach traktowanych MPP⁺, toksycznym metabolitem MPTP. W neuronach ziarnistych mózdzku już po 12 h inkubacji w obecności MPP⁺ dochodzi do zmian ekspresji Cdk5, a także aktywacji kalpain i proteolizy p35 [Alvira i wsp., 2006]. Wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia i aktywację kalpain zaobserwowano także w komórkach linii neuroblastoma SH-SY5Y [Knaryan i wsp., 2013]. W reakcji na MPP⁺ może dojść również do zwiększonej degradacji p35 w proteasomie, co zaobserwowano zarówno po iniekcji MPP⁺ do prądkowia szczura, jak również w pierwotnej hodowli neuronów [Endo i wsp., 2009]. Zjawisko takie poprzedza cięcie p35 przez kalpainsy i może być efektem fosforylacji p35 przez Cdk5, która stymuluje ubikwitynację i degradację p35 w proteasomie [Patrick i wsp., 1998].

Mechanizm odpowiedzialny za niekorzystne efekty zaburzenia aktywności Cdk5 w chorobie Parkinsona jest złożony. Wśród substratów Cdk5 znajdują się liczne białka związane z patomechanizmem PD. Parkina, której mutacje są najczęstszym powodem genetycznie uwarunkowanej PD, może być fosforylowana przez Cdk5 na Ser131, czego efektem jest

obniżenie aktywności ligazy E3 i agregacja. Omówione zjawiska mogą prowadzić do akumulacji substratów Parkiny i do śmierci neuronów dopaminergicznych [Avraham i wsp., 2007]. Parkina bierze też udział w regulacji procesów eliminacji dysfunkcyjnych mitochondriów, więc jej zahamowanie może leżeć u podstaw dysfunkcji mitochondriów i stresu oksydacyjnego. Innym ważnym substratem Cdk5 jest proteaza serynowa HtrA2. Katalizowana przez Cdk5 fosforylacja zlokalizowanej w mitochondriach HtrA2 na Ser400 ma kluczowe znaczenie dla utrzymania właściwego potencjału błonowego w mitochondriach [Fitzgerald i wsp., 2012]. Zaburzenia funkcji mitochondriów są jedną z ważniejszych przyczyn stresu oksydacyjnego. Podwyższony poziom reaktywnych form tlenu i uszkodzeń wolnorodnikowych stwierdzono zarówno w badaniach próbek pochodzących od pacjentów, jak i w modelach eksperymentalnych PD [Sanders i Greenamyre, 2013]. Deregulacja aktywności Cdk5 może przyczynić się do powstawania stresu oksydacyjnego również poprzez fosforylację peroksyredoksyny 2 (Prx2) na Thr89, co hamuje jej antyoksydacyjne działanie [Qu i wsp., 2007; Zhang i wsp. 2012]. Ponadto, nadmierna aktywacja Cdk5 może zaburzyć działanie mechanizmów służących naprawie uszkodzeń oksydacyjnych DNA. Fosforylacja Ape1 na Thr232 zmniejsza jej aktywność endonukleazy, a fosforylacja PARP-1 na Ser782, Ser785 lub Ser786 obniża aktywność procesu poli(ADP-rybozyl)acji, przyczyniając się do akumulacji uszkodzeń DNA i śmierci komórek [Huang i wsp., 2010; Bolin i wsp., 2012].

Zaburzenia procesu autofagii są kolejnym elementem patomechanizmu PD, który podlegać może regulacji przez kinazę Cdk5 [Wong i wsp., 2011; Janda i wsp., 2012]. Katalizowana przez Cdk5 fosforylacja EndoB1 na Thr145 wydaje się być niezbędnym warunkiem aktywacji autofagii. Ponieważ autofagia jest jedynym możliwym mechanizmem usuwania agregatów białkowych i uszkodzonych organelli w neuronach, jej zaburzenia prowadzą do akumulacji złogów białkowych, typowych dla chorób neurodegeneracyjnych [Banerjee i wsp., 2010].

Agregacja i akumulacja ASN jest ważnym elementem patofizjologii PD. ASN jest głównym składnikiem ciał Lewy'ego, będących neuropatologicznym wskaźnikiem PD. Ostatnie lata przyniosły liczne odkrycia wskazujące, że zaburzenia funkcji i struktury ASN mogą mieć miejsce także w innych chorobach neurodegeneracyjnych, m.in. w otępieniu z ciałami Lewy'ego, chorobie Alzheimera, i w innych schorzeniach określanych mianem synukleinopatii. Co więcej, wykazano, że w warunkach stresu komórkowego ASN może być uwalniana do przestrzeni pozakomórkowej, dzięki czemu może się rozprzestrzeniać w tkance

i oddziaływać na sąsiednie komórki [Lee i wsp., 2005; Adamczyk i wsp., 2007]. Znanych jest wiele mechanizmów toksycznego działania ASN [Kaźmierczak i wsp., 2013; Wilkaniec i wsp., 2013], ale niewiele wiadomo o udziale kinazy Cdk5 w tych zjawiskach. Sugerowano jedynie, że interakcje ASN i Cdk5 mogą leżeć u podstaw dysfunkcji synaps [Takahashi i wsp., 2000].

Wyjaśnienie roli Cdk5 w mechanizmach toksyczności alfa-synukleiny było celem prac #2 i #3. W pracy pt. „A novel mechanism of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) neurotoxicity. Interplay between p53 protein and cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5).” (Kaźmierczak i wsp. *Neurochem Int.* 2011 Feb; 58: 206-14.) skupiliśmy się na roli Cdk5 w mechanizmach śmierci komórek wywołanej przez zewnątrzkomórkowy peptyd NAC. Peptyd NAC (ang. non-A β component of Alzheimer's disease amyloid) został odkryty jako istotny komponent złogów amyloidowych wyizolowanych z mózgów pacjentów cierpiących na AD [Ueda i wsp., 1993]. Dalsze badania wykazały, że jest on fragmentem większego białka - ASN/NACP (ang. NAC precursor). W strukturze ASN domena NAC zlokalizowana jest w centralnej części łańcucha peptydowego (aminokwasy 61-95) i ze względu na swoje hydrofobowe właściwości odpowiedzialna jest za fibrylizację i toksyczne działanie ASN *in vitro* i *in vivo* [El-Agnaf i wsp., 1998; Forloni i wsp., 2000; Bodles i wsp., 2001; Giasson i wsp., 2001; Adamczyk i wsp., 2005; Park i wsp., 2008; Kim i wsp., 2009; O'Hare i wsp., 2010; Liu i wsp., 2013]. W naszych badaniach do medium hodowlanego komórek linii PC12 dodawano formę rozpuszczalną peptydu NAC o stężeniu 10 μ M. Już po 1 godzinie inkubacji komórek w obecności peptydu NAC doszło w mitochondriach do zaburzeń potencjału błonowego, które narastały w czasie do 4 h. Jedną z konsekwencji dysfunkcji mitochondriów jest zwiększona produkcja wolnych rodników i innych reaktywnych form tlenu (RFT). Stres oksydacyjny jest istotnym komponentem patomechanizmu chorób neurodegeneracyjnych. Wolne rodniki w znaczący sposób wpływają na proces agregacji i pozakomórkowej sekrecji ASN [Krishnan i wsp., 2003]. Protekcyjne efekty zastosowania zmiatacza wolnych rodników PBN (N-tert-butylo-alfa-fenylonitron) dowodzą, że zwiększona produkcja RFT jest ważnym elementem mechanizmu toksycznego działania NAC. Jednym z efektów zwiększonej produkcji wolnych rodników jest aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i zwiększenie ekspresji kontrolowanych przez niego genów, w tym *Tp53* [Tanaka i wsp., 2002; Wu i Lozano, 1994]. Białko supresorowe p53, znane jako „strażnik genomu”, jest również czynnikiem transkrypcyjnym kontrolującym ekspresję szeregu genów biorących udział w regulacji cyklu komórkowego, naprawie uszkodzeń DNA i apoptozie, w tym genu

Bax. W zdrowych komórkach białko p53 utrzymywane jest na niskim poziomie ekspresji dzięki interakcji z białkiem Hdm2 odpowiedzialnym za ubikwitynację i degradację p53. W odpowiedzi na komórkowy lub środowiskowy stres poziom białka p53 wzrasta, czego efektem jest zatrzymanie proliferacji umożliwiające naprawę uszkodzeń DNA, ewentualnie eliminacja komórki na drodze apoptozy, jeśli uszkodzenia DNA są zbyt silne. Nasze badania wykazały, że w komórkach inkubowanych w obecności NAC dochodzi do zwiększenia ekspresji genu kodującego p53. Ponieważ zmiatacz wolnych rodników PBN nie miał wpływu na poziom mRNA dla *Tp53*, przypuszczać można, że również inny, niezależny od stresu oksydacyjnego mechanizm musi być zaangażowany w indukcję transkrypcji genu *Tp53* przez NAC. Dowodem zwiększonej aktywności p53 w komórkach inkubowanych w obecności NAC jest wzrost ekspresji pro-apoptotycznego białka *Bax*. Stwierdziliśmy również zwiększoną translokację *Bax* do jądra i mitochondriów. O ważnej roli białka p53 w mechanizmach toksyczności NAC świadczą wyniki eksperymentu z zastosowaniem inhibitora p53, alfa-pifitryny, która skutecznie zapobiegała obumieraniu komórek wywołanemu przez NAC. Wyniki naszych badań wskazują, że w wyniku działania NAC dochodzi do dysfunkcji mitochondriów, zwiększonej produkcji wolnych rodników i aktywacji apoptozy na drodze zależnej od p53. Po 48 godzinach inkubacji w obecności NAC odnotowano obniżenie przeżywalności komórek o 65%. Wykonane w takim samym czasie barwienie metodą Hoechst wykazało, że kondensację chromatyny i fragmentację jądra, będące typowymi oznakami apoptozy, zaobserwować można u około 21% komórek. Możliwą przyczyną tej różnicy jest udział innych form programowanej śmierci komórki. Badania morfologii komórek wykonane z wykorzystaniem techniki mikroskopii elektronowej dowiodły, że oprócz zmian typowych dla apoptozy, w niektórych komórkach dochodzi do aktywacji procesu autofagii, o czym świadczyło m.in. pojawienie się wakuoli autofagowych.

Ze względu na kluczowe znaczenie białka p53 w procesie apoptozy, dalsze badania miały na celu wyjaśnienie znaczenia kinazy Cdk5, która może regulować funkcję p53 [Schmid i wsp., 2006; Lee i wsp., 2007]. Katalizowana przez Cdk5 fosforylacja p53 na Ser15, Ser 20, Ser33 lub Ser46 poprzez oddziaływanie na interakcje z białkiem Hdm2 powoduje zahamowanie degradacji, wzrost poziomu i aktywności p53 [Lee i wsp., 2007; Ajay i wsp., 2010]. Nasze badania wykazały wzrost poziomu mRNA dla *Cdk5*, *Cdk5r1* (p35) i *Cdk5r2* (p39) w komórkach inkubowanych w obecności NAC. Opublikowane wcześniej wyniki dowiodły, że zwiększona ekspresja Cdk5 lub p25 powoduje wzrost ekspresji i aktywności p53 [Zhang i

wsp., 2002]. Sugeruje to, że zmiany ekspresji i aktywności Cdk5, poprzez wpływ na p53, mogą być ważnym komponentem mechanizmu toksyczności peptydu NAC. Jednym z czynników odpowiedzialnych za wzrost ekspresji Cdk5 i p35 może być stres oksydacyjny [Strocchi i wsp., 2003]. Jednak nasze badania wykazały, że zmiatacz wolnych rodników PBN nie wpływa na poziom mRNA dla tych genów, co potwierdza wcześniejszą hipotezę o udziale niezależnego od stresu oksydacyjnego mechanizmu w aktywacji transkrypcji genów przez NAC. Podwyższenie poziomu białek p35 i p39, które jest głównym mechanizmem regulacji funkcji Cdk5, sugeruje, że w komórkach traktowanych peptydem NAC może dochodzić do wzrostu aktywności tej kinazy. W celu weryfikacji, jakie znaczenie ma aktywacja Cdk5 w mechanizmie toksycznego działania peptydu NAC, wykonano eksperyment z zastosowaniem inhibitora Cdk5, BML-259. Inhibicja Cdk5 wykazała działanie protekcyjne, zapobiegając obumieraniu komórek wywołanemu przez NAC. Wskazuje to na kluczową rolę kinazy Cdk5 w kaskadzie zjawisk wywołanych przez peptyd NAC i prowadzących do śmierci komórek.

W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano, że kinaza Cdk5 odgrywa ważną rolę w molekularnym mechanizmie toksyczności peptydu NAC. Peptyd NAC aktywuje kaskadę zjawisk, która poprzez zaburzenia funkcji mitochondriów, wzrost produkcji wolnych rodników i aktywację białka p53, prowadzi ostatecznie do aktywacji apoptozy i autofagii oraz do śmierci komórek. Kinaza Cdk5 może oddziaływać na wielu etapach tego szlaku, wpływając na funkcje mitochondriów, poziom stresu oksydacyjnego jak również na p53.

Celem dalszych badań było szczegółowe wyjaśnienie mechanizmu aktywacji Cdk5. **W pracy pt. „Extracellular alpha-synuclein induces calpain-dependent overactivation of cyclin-dependent kinase 5 in vitro.” (Czapski i wsp. FEBS Lett. 2013;587(18):3135-41.) przedstawiono badania dotyczące udziału Cdk5 w molekularnym mechanizmie toksyczności ASN.** W badaniach zastosowano rozpuszczalną formę ASN, w skład której wchodzi głównie monomery (ok. 17 kDa) i dimery (ok. 34 kDa). Należy przypuszczać, że w warunkach 48-godzinnej inkubacji ASN w medium hodowlanym zachodzą procesy dalszej oligomeryzacji i agregacji, dlatego nie można wykluczyć udziału innych niż monomery i dimery form ASN w analizowanych zjawiskach. Wcześniejsze badania naszego zespołu udowodniły, że forma rozpuszczalna ASN, w odróżnieniu od formy zagregowanej, działa cytotoksycznie na komórki PC12 [Kaźmierczak i wsp., 2008]. W celach porównawczych w wybranych eksperymentach zastosowano izoformę beta synukleiny (BSN). Białko to, uznawane za nieposiadające właściwości neurotoksycznych, a nawet działające

neuroprotekcynie, w niektórych modelach eksperymentalnych wykazuje jednak pewne właściwości cytotoksyczne, związane prawdopodobnie ze zdolnością do fibrylizacji [Taschenberg i wsp., 2013]. Wykonane eksperymenty dowiodły jednak, że o ile ASN dodana do hodowli komórek PC12 w formie monomerów/dimerów powoduje spadek przeżywalności komórek, ta sama monomeryczno/dimeryczna forma BSN użyta w tym samym stężeniu (10 μ M) nie działa cytotoksycznie. Podobne wnioski sformułować można na podstawie wyników pomiaru zmian stężenia wapnia w komórkach. ASN powoduje w komórkach PC12 natychmiastowy (już po kilkunastu sekundach) wzrost stężenia wapnia, który utrzymuje się przez wiele godzin. BSN nie wykazuje wpływu na homeostazę wapniową. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze obserwacje uzyskane na synaptozomach i skrawkach z mózgu szczura, które wykazały, że zmiany wywoływane przez ASN i NAC są zależne od receptorów jonotropowych NMDA i od zależnych od napięcia kanałów wapniowych typu N [Adamczyk i Strosznajder, 2006; Adamczyk i wsp., 2009]. Zaburzenia homeostazy wapniowej są stałym elementem mechanizmów neurotoksyczności, występującym w patomechanizmie różnych chorób neurodegeneracyjnych, włączając w to chorobę Alzheimera i Parkinsona [Wojda i wsp., 2008; Salińska i Łazarewicz; 2012]. Jedną z konsekwencji wzrostu stężenia wapnia w cytoplazmie jest aktywacja kalpain i proteolityczne cięcie białek aktywatorowych p35 i p39. Nasze badania wykazały, że w komórkach PC12 inkubowanych w obecności ASN dochodzi do wzrostu poziomu białka p25, co potwierdza, że wywołany przez ASN wzrost stężenia wapnia w cytoplazmie prowadzi do patologicznego zwiększenia aktywności kalpain. Białko p25, ze względu na większą od p35 stabilność, jest silniejszym aktywatorem Cdk5. Dodatkowo, ze względu na utratę miejsca mirystylacji, które w białku p35 mieści się na N-końcu, kompleks Cdk5-p25 ma zmienioną lokalizację w komórce, co może być przyczyną nieprawidłowości fosforylacji. Wyniki te sugerują, że ASN indukuje wzrost aktywności Cdk5 na drodze zależnej od Ca^{2+} i kalpain. Ponieważ przyłączenie białek aktywatorowych p35 i p39 jest głównym mechanizmem aktywacji Cdk5, zbadano ekspresję tych białek na poziomie mRNA i białka. Stwierdzono, że ASN nie powoduje zmian poziomu tych białek. Aktywność kinazy Cdk5 może być dodatkowo regulowana przez modyfikacje potranslacyjne, takie jak fosforylacja i S-nitrozylacja. Jak wykazała analiza immunochemiczna, poziom ufosforylowanej na Tyr15 kinazy Cdk5 był znacząco wyższy w komórkach traktowanych ASN, w porównaniu do komórek kontrolnych. Taka modyfikacja powinna dodatkowo zwiększyć aktywność kinazy Cdk5. Celem kolejnych eksperymentów była weryfikacja hipotezy badawczej o istotnej roli

aktywacji Cdk5 w molekularnym mechanizmie toksyczności ASN. Wykorzystując inhibitory Cdk5, roskowitynę i BML-259, oraz inhibitor kalpain, kalpeptynę, wykonano analizę przeżywalności komórek narażonych na obecność zewnątrzkomórkowej ASN. Dodanie do medium inkubacyjnego kalpeptyny, roskowityny i BML-259 nie miało wpływu na przeżywalność komórek PC12 w warunkach kontrolnych. Wszystkie inhibitory bardzo skutecznie chroniły komórki przed cytotoksycznym działaniem ASN, potwierdzając kluczową rolę aktywacji kalpain i Cdk5 w molekularnym mechanizmie toksyczności ASN. Ponieważ ASN indukuje śmierć komórek głównie na drodze apoptozy, naszym kolejnym celem było sprawdzenie, czy szlak Ca^{2+} -kalpainy-p25-Cdk5 uczestniczy w aktywacji procesów apoptotycznych. Do analizy wybrano barwienie metodą Hoechst, która pozwala na uwidocznienie struktury jądra i na identyfikację komórek w późnej fazie apoptozy. W komórkach takich wyraźnie widoczna jest kondensacja chromatyny i fragmentacja jądra. Analiza w mikroskopie fluorescencyjnym wykazała, że kalpeptyna efektywnie obniża liczbę komórek apoptotycznych. Jeszcze bardziej skuteczne działanie wykazywały inhibitory Cdk5. Wyniki te potwierdzają znaczenie aktywacji Cdk5 w kaskadzie zjawisk wywołanych w komórkach przez zewnątrzkomórkową ASN i prowadzących do apoptotycznej śmierci.

W pracy tej po raz pierwszy udowodniono udział Cdk5 w molekularnych mechanizmach toksyczności zewnątrzkomórkowej ASN. Zaproponowano wyjaśnienie kaskady zjawisk prowadzącej do aktywacji Cdk5. Zademonstrowano mechanizm aktywacji Cdk5 przez ASN: 1) zależny od fosforylacji tyrozyny 15, 2) zależny od proteolitycznego cięcia p35. Przy użyciu inhibitorów Cdk5 potwierdzono kluczowe znaczenie tej kinazy w procesach degeneracji i śmierci komórek wywołanej przez ASN.

Badania genetyczne dotyczące roli Cdk5 w chorobie Alzheimera

Równoległe do badań eksperymentalnych, które mają za zadanie wyjaśnić molekularne podstawy chorób neurodegeneracyjnych, prowadzone są badania genetyczne. Badania te są pomocne nie tylko w rozpoznaniu molekularnych mechanizmów neurodegeneracji, ale także pozwalają na oszacowanie klinicznego znaczenia polimorfizmu genów i ewentualnych predyspozycji wynikających z posiadania określonego wariantu genu. W przypadku choroby Alzheimera, badania genetyczne wniosły ogromny wkład w poznanie patomechanizmu choroby. To właśnie badania genetyczne dostarczyły przekonujących dowodów potwierdzających kluczową rolę zaburzeń metabolizmu amyloidu beta w

patomechanizmie AD. Badając przypadki rodzinnej formy AD (ang. familial AD; FAD) o wczesnym początku (ang. early onset AD; EOAD) stwierdzono, że mutacje w 3 genach (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*) warunkują około 50% przypadków tej postaci choroby. Gen *APP* (21q21.2) koduje białko prekursorowe A β . Począwszy od roku 1990 znaleziono w tym genie ponad 20 mutacji warunkujących FAD, które zaburzając aktywność sekretaz powodują nasiloną amyloidogenezę i wzmożone wytwarzanie A β [Levy i wsp., 1990; Goate i wsp., 1991]. Znane są również mutacje *APP* nie związane z ryzykiem AD lub działające protekcyjnie (poprzez zmniejszenie amyloidogenezy) [Jonsson i wsp., 2012]. Mutacje w genach *PSEN1* (14q24.3) i *PSEN2* (1q42.1), kodujących ważne dla aktywności γ -sekretazy preseniliny 1 i 2, również zaburzają proces amyloidogenezy. Spośród 191 znanych mutacji w genie *PSEN1* większość ma charakter patogeny – mutacje w tym genie są najczęstszą przyczyną formy AD o wczesnym początku. W genie *PSEN2* odkryto do tej pory 24 mutacje, z których tylko 11 ma charakter patogeny. Przypadki FAD-EOAD są jednak stosunkowo nieliczne i stanowią około 5-10% wszystkich chorych, większość przypadków AD to postać późna, z objawami klinicznymi pojawiającymi się po 65 roku życia (ang. late onset AD; LOAD). W przypadku tej formy choroby czynniki genetyczne również odgrywają ważną rolę. W odróżnieniu od FAD-EOAD, gdzie AD dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący według praw Mendla, w przypadku LOAD mamy do czynienia ze współdziałaniem wielu czynników genetycznych i środowiskowych. Najważniejszym uznanym czynnikiem genetycznym ryzyka LOAD jest polimorfizm genu apolipoproteiny E *APOE* (19q13). Obecność w genomie allelu $\epsilon 4$ zwiększa ryzyko AD czterokrotnie w przypadku jednego allelu, i dziesięciokrotnie w przypadku 2 alleli. Z kolei obecność allelu $\epsilon 2$ działa protekcyjnie [Strittmater i wsp., 1993; Corder i wsp., 1994]. Jednak w przypadku polimorfizmu *APOE*, określony genotyp nie determinuje wystąpienia AD, posiadanie allelu $\epsilon 4$ nie jest czynnikiem wystarczającym ani koniecznym dla rozwoju AD. Ponieważ te 4 geny (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, *APOE*) odpowiadają za około 30-50% dziedziczności AD, od lat trwają poszukiwania innych czynników genetycznych związanych z ryzykiem choroby. Do chwili obecnej opublikowano wyniki badań dotyczących setek różnych genów, baza danych AlzGene (URL: www.alzgene.org) zawiera informacje o 2973 polimorfizmach w 695 genach [Bertram i wsp. 2007].

Celem pracy pt. „Association between plasma biomarkers, CDK5 polymorphism and the risk of Alzheimer's disease.” (Czapski i wsp. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2012;72(4):397-411.) było zbadanie związku polimorfizmu genu *CDK5* (7q36) z ryzykiem choroby

Alzheimera w polskiej populacji. Ponieważ poprzednio opublikowane analizy dotyczące związku polimorfizmu tego genu z ryzykiem AD dały sprzeczne wyniki, w badaniach skupiliśmy się na 3 polimorfizmach pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism; SNP), które w poprzednich badaniach dawały pozytywne wyniki [Rademakers i wsp. 2005, Reiman i wsp. 2007, Li i wsp. 2008, Arias-Vasquez i wsp. 2008, Vázquez-Higuera i wsp. 2009]. Analizie poddano rs2069454 (G>C), rs2069442 (C>G) i rs9278 (G>A).

Polimorfizm rs2069442 położony jest w sekwencji promotorowej genu *CDK5*, rs2069454 w intronie 5, a rs9278 w regionie nieulegającym translacji 3' (3'UTR). Takie położenie sprawia, że nie mogą mieć one wpływu na sekwencję białka, a więc nie wpływają bezpośrednio na jego funkcję. Sekwencje takie zawierają jednak liczne elementy regulatorowe, dzięki czemu modyfikacje w ich obrębie mogą wpływać na poziom białka na każdym etapie ekspresji materiału genetycznego, poprzez oddziaływanie na transkrypcję, stabilność mRNA i proces translacji.

Związek polimorfizmu rs2069454 z ryzykiem AD był badany w kilku ośrodkach naukowych. Rademakers i wsp. [2005] zaobserwowali dwukrotny wzrost ryzyka AD związany z posiadaniem allelu C w populacji holenderskiej i szwedzkiej. To odkrycie zainspirowało kolejnych badaczy, którzy otrzymali jednak odmienne wyniki. Reiman i wsp. [2007] w populacji holenderskiej, Li i wsp. [2008] w populacji kanadyjskiej, AriasVasquez i wsp. [2008] w populacji holenderskiej, Vazquez-Higuera i wsp. [2009] w populacji hiszpańskiej nie potwierdzili tej zależności. Również nasze badania nie wykazały różnic w dystrybucji genotypów polimorfizmu rs2069454 pomiędzy grupą kontrolną i grupą chorych. Wykonana przez nas meta-analiza wszystkich dostępnych danych ujawniła znaczną niezgodność wyników. Ponieważ źródłem tej zmienności pomiędzy poszczególnymi badaniami były dane pochodzące z pracy Rademakers i wsp. [2005], danych tych nie uwzględniono w ponownej meta-analizie, wykonanej zarówno dla tego polimorfizmu, jak i 2 pozostałych. Co ciekawe, powtórna meta-analiza polimorfizmu rs2069454, wykonana na zmniejszonej liczbie danych, wykazała istnienie związku z ryzykiem AD. Wyjaśnienie powodów zmienności danych oraz potwierdzenie związku polimorfizmu rs2069454 z ryzykiem AD wymaga wykonania dodatkowych badań na większych grupach pacjentów.

Badania znaczenia polimorfizmu rs2069442 dały niejednoznaczne wyniki. Rademakers i wsp. [2005] w badaniach obejmujących holenderską i szwedzką populację nie stwierdzili związku rs2069442 i ryzykiem AD. Jednak Arias-Vasquez i wsp. [2008] odkryli, że w

holenderskiej populacji genotyp GG w grupie nosicieli allelu $\epsilon 4$ genu apolipoproteiny E zwiększa ryzyko AD prawie dwukrotnie. Vazquez-Higuera i wsp. [2009] nie potwierdzili tej zależności w badaniach wykonanych na populacji hiszpańskiej. Również nasza analiza nie wykazała różnic w dystrybucji genotypu GG pomiędzy grupą kontrolną i grupą chorych. Także meta-analiza nie potwierdziła związku tego polimorfizmu z ryzykiem AD.

Również wcześniejsze badania polimorfizmu rs9278 nie wykazały jasno jego związku z ryzykiem AD. Wprawdzie badania na populacji holenderskiej wykonane przez grupę Arias-Vasquez i wsp. [2008] zasugerowały istotny trend związany z posiadaniem genotypu AA (OR=0,65) lub GA (OR=0,84), jednak w badaniach Rademakers i wsp. [2005] (populacja holenderska i szwedzka) oraz Vazquez-Higuera i wsp. [2009] (populacja hiszpańska) wyniki te nie zyskały potwierdzenia. Również badania wykonane przez nasz zespół nie wykazały związku polimorfizmu rs9027 z ryzykiem AD. Podobne wyniki dała meta-analiza.

Wykonane badania genetyczne nie potwierdziły jednoznacznie bezpośredniego związku polimorfizmu genu *CDK5* z ryzykiem AD. Porównanie częstości genotypów, alleli, haplotypów i diplotypów pomiędzy grupami (kontrolą, LOAD i EOAD) wykazało zupełny brak różnic. Możliwe jest jednak, że ewentualny wpływ genotypu *CDK5*, sugerowany przez wyniki meta-analizy, może być zależny od innych czynników, zarówno genetycznych, jak i środowiskowych. W naszej analizie uwzględniono genotyp *APOE* i wybrane parametry biochemiczne osocza krwi, tj. stężenie cholesterolu całkowitego, HDL, LDL, trójglicerydów, homocysteiny, kwasu foliowego i witaminy B₁₂. Stwierdzono, zgodnie z oczekiwaniami, różnice częstości występowania allelu $\epsilon 4$ pomiędzy grupą osób zdrowych i grupą chorych LOAD. Zaobserwowano również u osób cierpiących na AD podwyższone stężenie całkowitego cholesterolu, frakcji LDL i homocysteiny, oraz obniżone stężenie frakcji HDL i witaminy B₁₂. Analiza związku polimorfizmu *CDK5* z genotypem *APOE* i z poziomem parametrów biochemicznych wykazała brak wiarygodnych zależności.

Analizując znaczenie czynników genetycznych zmieniających ryzyko AD poprzez wpływ na aktywność lub funkcję Cdk5 konieczne jest uwzględnienie roli białek bezpośrednio modulujących aktywność Cdk5. W badaniach Mateo i wsp. [2009] przeanalizowano polimorfizm rs735555, leżący w regionie 3'UTR genu *CDK5R1*, kodującego białko aktywatorowe Cdk5 – p35. Równocześnie zbadano znaczenie polimorfizmu rs334558 w genie *GSK3B*. Stwierdzono, że posiadanie genotypu AA (*CDK5R1*; rs735555) i jednocześnie CC (*GSK3B*; rs334558) ponad dwunastokrotnie obniża ryzyko AD, co potwierdza istotną rolę

interakcji pomiędzy Cdk5 i Gsk-3 β w patomechanizmie AD. Co ciekawe, na istotne znaczenie interakcji genowych pomiędzy *CDK5R1* i *GSK3B* wskazują również badania dotyczące ryzyka choroby Parkinsona [Das i wsp., 2012].

Dzięki poznaniu sekwencji ludzkiego genomu i rozwojowi nowych technik badawczych, który nastąpił w ostatnich latach, możliwe jest obecnie prowadzenie badań asocjacji w skali całego genomu (ang. genome-wide association studies; GWAS). Badania GWAS umożliwiają przeanalizowanie nawet miliona SNP u jednego pacjenta i ułatwiają odkrycie nowych, wcześniej niewiązanych z chorobą *loci* genowych. Dzięki badaniom GWAS wykonanym na wielkich, liczących tysiące pacjentów, kohortach ustalono, że związek z ryzykiem AD mają geny *ATXN1*, *CD33*, *CLU*, *CR1*, *PICALM*, *BIN1*, *CD2AP*, *MS4A6A/MS4A4E*, *EPHA1*, *ABCA7* i niezidentyfikowany locus na chromosomie 14 (GWA_14q31.2) [Bertram i wsp., 2008; Harold i wsp., 2009; Lambert i wsp., 2009; Hollingworth i wsp., 2011; Naj i wsp., 2011]. Chociaż zagadnienie to wymaga dalszych badań, przypuszcza się, że oddziaływanie tych czynników genetycznych na patomechanizm AD związane jest z wpływem na poziom A β (*CD33*, *CLU*, *CR1*, *PICALM*, *BIN1*, *ATXN1*), metabolizm lipidów (*ABCA7*), z regulacją wrodzonych mechanizmów układu odpornościowego (*CD33*, *CLU*, *CR1*, *EPHA1*) i przekazywania komórkowego (*PICALM*, *BIN1*, *ABCA7*, *CD2AP*, *EPHA1*, *MS4A6A/MS4A4E*) [Tanzi i wsp., 2012]. Mimo, że związek tych genów z AD został ewidentnie potwierdzony, należy zauważyć, że ich wpływ na ryzyko AD jest niewielki, OR wynosi 1,1-1,2 (dla porównania dla *APOE* OR wynosi od 4 do 15). Szacuje się, że obecny stan wiedzy pozwala na wyjaśnienie nieco ponad połowy dziedziczności AD, wiele czynników genetycznych czeka na odkrycie.

Podsumowanie

Wspólną cechą chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Alzheimera i Parkinsona, są zaburzenia dotyczące konformacji specyficznych białek, prowadzące do ich gromadzenia w układzie nerwowym i do powstawania nierozpuszczalnych złogów. Oligomery amyloidu β ($A\beta$), hiperfosforylowane białko MAP tau oraz α -synukleina (ASN) mają kluczowe znaczenie w patomechanizmie tych schorzeń, zaburzają wiele procesów molekularnych, w tym procesy fosforylacji i defosforylacji. Kinaza cyklozależna 5 (Cdk5) jest ważnym elementem komórkowych mechanizmów neurodegeneracji. W warunkach fizjologicznych Cdk5 bierze udział w regulacji rozwoju ośrodkowego układu nerwowego, w regulacji neuroprzebieżności, transportu aksonalnego i szlaków odpowiedzialnych za śmierć lub przeżycie komórki. Zaburzenia aktywności Cdk5, które pojawiają się w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych, mogą prowadzić do nieprawidłowej fosforylacji licznych substratów, co niekorzystnie wpływa na prawidłowe funkcjonowanie komórki. Zmiany aktywności kinazy syntazy glikogenu 3β (Gsk- 3β) również przyczyniają się do zaburzeń związanych z procesami neurodegeneracji. Przeprowadzone badania wykazały istotne znaczenie kinazy Cdk5 w molekularnych mechanizmach toksyczności białek o zaburzonej konformacji, a także udowodniły, że oddziaływanie pomiędzy Cdk5 i Gsk- 3β są ważnym elementem tych mechanizmów.

Jednym ze znanych skutków nadmiernej aktywacji Cdk5 jest hiperfosforylacja białka MAP tau, która zmienia jego właściwości biochemiczne, hamuje zdolność stabilizacji mikrotubul i powoduje zaburzenia funkcji cytoszkieletu, ale także prowadzi do powstawania wewnątrzkomórkowych agregatów tau, znanych jako splątki neurofibrilarne. Nowych informacji na temat roli Cdk5 w hiperfosforylacji białka tau dostarczyły badania przeprowadzone na komórkach PC12 stabilnie transfekowanych ludzkim genem APP i produkujących duże ilości $A\beta$. Stwierdzono, że w komórkach tych dochodzi do zmniejszenia aktywności Cdk5, co powoduje obniżenie poziomu fosforylacji seryny 9 w Gsk- 3β , i w efekcie prowadzi do wzrostu jej aktywności i do hiperfosforylacji białka MAP tau. Uzyskane wyniki wykazały, że nie tylko wzrost aktywności Cdk5, ale również spadek, mogą w efekcie powodować zaburzenia fosforylacji białka tau.

Do chwili obecnej niewiele było wiadomo o roli Cdk5 w mechanizmach cytotoksycznego działania ASN. Eksperymenty prowadzone in vitro wykazały kluczowe

znaczenie Cdk5 w molekularnych mechanizmach toksyczności ASN i pozwoliły na odkrycie mechanizmu aktywacji Cdk5 przez to białko. Napływ jonów wapnia, wywołany działaniem zewnątrzkomórkowej ASN, prowadzi do zależnej od kalpain proteolizy białka aktywatorowego p35 i do powstania formy skróconej p25. Białko p25 jest odpowiedzialne za wzrost aktywności Cdk5 w komórkach. Równocześnie dochodzi do zwiększenia poziomu fosforylacji Cdk5 na Tyr15, co również powoduje wzrost aktywności tej kinazy. Stwierdzono, że również peptyd NAC (ang. non-A β component of Alzheimer's disease amyloid), który jako wewnętrzna, hydrofobowa domena ASN jest odpowiedzialny za jej fibrylizację i cytotoksyczne właściwości, powoduje aktywację Cdk5 w komórkach. Wykonane badania wykazały, że NAC, podobnie jak ASN, powoduje zaburzenia mitochondrialne i stres oksydacyjny, co prowadzi do śmierci komórek w mechanizmie zależnym od Cdk5 i p53. Wyniki te wskazują na możliwość intensyfikacji cytotoksycznego działania ASN przez uwalnianie w drodze degradacji peptyd NAC.

W kolejnych doświadczeniach podjęto próbę określenia związku polimorfizmu genu CDK5 z ryzykiem choroby Alzheimera (AD) w polskiej populacji. Wykonano analizę trzech polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP), rs2069454, rs2069442 i rs9278. Badania wykazały brak związku tych SNP z ryzykiem AD w polskiej populacji, jednak wyniki meta-analazy, obejmującej większą liczbę pacjentów także z innych ośrodków, wykazały, że rs2069454 może wpływać na ryzyko AD. Wyniki te potwierdzają ważną rolę Cdk5 w patomechanizmie chorób neurodegeneracyjnych Alzheimera i Parkinsona.

Do najważniejszych osiągnięć mojej pracy należy:

1. Wykazanie obniżenia aktywności Cdk5 w zmodyfikowanych genetycznie komórkach PC12 cechujących się ekspresją ludzkiego genu *APP* i zwiększonym uwalnianiem peptydów amyloidu β .
2. Stwierdzenie, że zmiany aktywności Cdk5, zarówno wzrost jak i obniżenie, mogą mieć negatywne konsekwencje w postaci zależnej od Gsk-3 β hiperfosforylacji białka MAP tau i wykazanie istotnego znaczenia interakcji pomiędzy Cdk5 i Gsk-3 β w mechanizmach toksyczności A β .
3. Wykazanie, że kinaza Cdk5 odgrywa ważną rolę w molekularnym mechanizmie toksyczności peptydu NAC. Cdk5 może oddziaływać na wielu etapach szlaku śmierci komórek wywołanej przez peptyd NAC, wpływa na funkcje mitochondriów, poziom stresu oksydacyjnego jak również na p53.
4. Wykazanie po raz pierwszy, że kinaza Cdk5 jest bardzo ważnym komponentem molekularnych mechanizmów toksyczności zewnątrzkomórkowej ASN. Zaprezentowanie mechanizmu aktywacji Cdk5 przez ASN: 1) zależnego od fosforylacji tyrozyny 15, 2) zależnego od proteolitycznego cięcia p35.
5. Stwierdzenie na podstawie meta-analizy, że polimorfizm pojedynczego nukleotydu rs2069454 w genie kinazy cyklinozależnej 5 (*CDK5*) może mieć związek z ryzykiem zachorowania na chorobę Alzheimera.

Literatura

1. Adamczyk A, Czapski GA, Jeśko H, Strosznajder RP. Non A beta component of Alzheimer's disease amyloid and amyloid beta peptides evoked poly(ADP-ribose) polymerase-dependent release of apoptosis-inducing factor from rat brain mitochondria. *J Physiol Pharmacol*. 2005 Mar;56 Suppl 2:5-13.
2. Adamczyk A, Czapski GA, Kaźmierczak A, Strosznajder JB. Effect of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists on alpha-synuclein-evoked neuronal nitric oxide synthase activation in the rat brain. *Pharmacol Rep*. 2009 Nov-Dec;61(6):1078-85.
3. Adamczyk A, Jeśko H, Strosznajder RP. Alzheimer's disease related peptides affected cholinergic receptor mediated poly(ADP-ribose) polymerase activity in the hippocampus. *Folia Neuropathol*. 2005;43(3):139-42.
4. Adamczyk A, Kacprzak M, Kaźmierczak A. Alpha-synuclein decreases arachidonic acid incorporation into rat striatal synaptoneuroosomes. *Folia Neuropathol*. 2007;45(4):230-5.
5. Adamczyk A, Strosznajder JB. Alpha-synuclein potentiates Ca²⁺ influx through voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Neuroreport*. 2006 Dec 18;17(18):1883-6.
6. Ahlijanian MK, Barrezueta NX, Williams RD, Jakowski A, Kowsz KP, McCarthy S, Coskran T, Carlo A, Seymour PA, Burkhardt JE, Nelson RB, McNeish JD. Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 14;97(6):2910-5.
7. Ajay AK, Upadhyay AK, Singh S, Vijayakumar MV, Kumari R, Pandey V, Boppana R, Bhat MK. Cdk5 phosphorylates non-genotoxically overexpressed p53 following inhibition of PP2A to induce cell cycle arrest/apoptosis and inhibits tumor progression. *Mol Cancer*. 2010 Jul 31;9:204.
8. Alvarez A, Muñoz JP, Maccioni RB. A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res*. 2001 Apr 1;264(2):266-74.
9. Alvarez A, Toro R, Cáceres A, Maccioni RB. Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett*. 1999 Oct 15;459(3):421-6.
10. Alvira D, Ferrer I, Gutierrez-Cuesta J, Garcia-Castro B, Pallàs M, Camins A. Activation of the calpain/cdk5/p25 pathway in the girus cinguli in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2008;14(4):309-13.
11. Alvira D, Tajés M, Verdaguer E, Acuña-Castroviejo D, Folch J, Camins A, Pallas M. Inhibition of the cdk5/p25 fragment formation may explain the antiapoptotic effects of melatonin in an experimental model of Parkinson's disease. *J Pineal Res*. 2006 Apr;40(3):251-8.
12. Arias-Vásquez A, Aulchenko YS, Isaacs A, van Oosterhout A, Slegers K, Hofman A, van Broeckhoven C, Oostra BA, Breteler M, van Duijn CM. Cyclin-dependent kinase 5 is associated with risk for Alzheimer's disease in a Dutch population-based study. *J Neurol*. 2008 May;255(5):655-62.
13. Asada A, Saito T, Hisanaga S. Phosphorylation of p35 and p39 by Cdk5 determines the subcellular location of the holokinase in a phosphorylation-site-specific manner. *J Cell Sci*. 2012 Jul 15;125(Pt 14):3421-9.
14. Asada A, Yamamoto N, Gohda M, Saito T, Hayashi N, Hisanaga S. Myristoylation of p39 and p35 is a determinant of cytoplasmic or nuclear localization of active cyclin-dependent kinase 5 complexes. *J Neurochem*. 2008 Aug;106(3):1325-36.
15. Avraham E, Rott R, Liani E, Szargel R, Engelender S. Phosphorylation of Parkin by the cyclin-dependent kinase 5 at the linker region modulates its ubiquitin-ligase activity and aggregation. *J Biol Chem*. 2007 Apr 27;282(17):12842-50.
16. Banerjee R, Beal MF, Thomas B. Autophagy in neurodegenerative disorders: pathogenic roles and therapeutic implications. *Trends Neurosci*. 2010 Dec;33(12):541-9.
17. Bertram L, Lange C, Mullin K, Parkinson M, Hsiao M, Hogan MF, Schjeide BM, Hooli B, Divito J, Ionita I, Jiang H, Laird N, Moscarillo T, Ohlsen KL, Elliott K, Wang X, Hu-Lince D, Ryder M, Murphy A, Wagner SL, Blacker D, Becker KD, Tanzi RE. Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *Am J Hum Genet*. 2008 Nov;83(5):623-32.
18. Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet*. 2007 Jan;39(1):17-23.
19. Bodles AM, Guthrie DJ, Greer B, Irvine GB. Identification of the region of non-Abeta component (NAC) of Alzheimer's disease amyloid responsible for its aggregation and toxicity. *J Neurochem*. 2001 Jul;78(2):384-95.

20. Bolin C, Boudra MT, Fernet M, Vaslin L, Pennaneach V, Zaremba T, Biard D, Cordelières FP, Favaudon V, Mégnin-Chanet F, Hall J. The impact of cyclin-dependent kinase 5 depletion on poly(ADP-ribose) polymerase activity and responses to radiation. *Cell Mol Life Sci.* 2012 Mar;69(6):951-62.
21. Brion JP, Couck AM. Cortical and brainstem-type Lewy bodies are immunoreactive for the cyclin-dependent kinase 5. *Am J Pathol.* 1995 Nov;147(5):1465-76.
22. Cancino GI, Perez de Arce K, Castro PU, Toledo EM, von Bernhardt R, Alvarez AR. c-Abl tyrosine kinase modulates tau pathology and Cdk5 phosphorylation in AD transgenic mice. *Neurobiol Aging.* 2011 Jul;32(7):1249-61.
23. Chae T, Kwon YT, Bronson R, Dikkes P, Li E, Tsai LH. Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron.* 1997 Jan;18(1):29-42.
24. Cheung ZH, Ip NY. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol.* 2012 Mar;22(3):169-75.
25. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature.* 1992 Dec 17;360(6405):672-4.
26. Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol.* 2009 Jul;11(7):909-13.
27. Cohen PT. Protein phosphatase 1-targeted in many directions. *J Cell Sci.* 2002 Jan 15;115(Pt 2):241-56.
28. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1994 Jun;7(2):180-4.
29. Crews L, Patrick C, Adame A, Rockenstein E, Masliah E. Modulation of aberrant CDK5 signaling rescues impaired neurogenesis in models of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis.* 2011 Feb 10;2:e120.
30. Crocker SJ, Smith PD, Jackson-Lewis V, Lamba WR, Hayley SP, Grimm E, Callaghan SM, Slack RS, Melloni E, Przedborski S, Robertson GS, Anisman H, Merali Z, Park DS. Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioral deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2003 May 15;23(10):4081-91.
31. Cruz JC, Kim D, Moy LY, Dobbin MM, Sun X, Bronson RT, Tsai LH. p25/cyclin-dependent kinase 5 induces production and intraneuronal accumulation of amyloid beta in vivo. *J Neurosci.* 2006 Oct 11;26(41):10536-41.
32. Cruz JC, Tseng HC, Goldman JA, Shih H, Tsai LH. Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron.* 2003 Oct 30;40(3):471-83.
33. Czapski GA, Gąssowska M, Songin M, Radecka UD, Strosznajder JB. Alterations of cyclin dependent kinase 5 expression and phosphorylation in amyloid precursor protein (APP)-transfected PC12 cells. *FEBS Lett.* 2011 Apr 20;585(8):1243-8.
34. Czapski GA, Gąssowska M, Wilkaniec A, Cieślik M, Adamczyk A. Extracellular alpha-synuclein induces calpain-dependent overactivation of cyclin-dependent kinase 5 in vitro. *FEBS Lett.* 2013 Sep 17;587(18):3135-41.
35. Czapski GA, Maruszak A, Styczyńska M, Żekanowski C, Safranow K, Strosznajder JB. Association between plasma biomarkers, CDK5 polymorphism and the risk of Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2012;72(4):397-411.
36. Das G, Misra AK, Das SK, Ray K, Ray J. Role of tau kinases (CDK5R1 and GSK3B) in Parkinson's disease: a study from India. *Neurobiol Aging.* 2012 Jul;33(7):1485.e9-15.
37. Eckert A, Steiner B, Marques C, Leutz S, Romig H, Haass C, Müller WE. Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation. *J Neurosci Res.* 2001 Apr 15;64(2):183-92.
38. El-Agnaf OM, Jakes R, Curran MD, Middleton D, Ingenito R, Bianchi E, Pessi A, Neill D, Wallace A. Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments. *FEBS Lett.* 1998 Nov 27;440(1-2):71-5.
39. Endo R, Saito T, Asada A, Kawahara H, Ohshima T, Hisanaga S. Commitment of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neuronal cell death by proteasome-mediated degradation of p35 cyclin-dependent kinase 5 activator. *J Biol Chem.* 2009 Sep 18;284(38):26029-39.
40. Engmann O, Giese KP. Crosstalk between Cdk5 and GSK3beta: Implications for Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci.* 2009 May 29;2:2.

41. Fitzgerald JC, Camprubi MD, Dunn L, Wu HC, Ip NY, Kruger R, Martins LM, Wood NW, Plun-Favreau H. Phosphorylation of HtrA2 by cyclin-dependent kinase-5 is important for mitochondrial function. *Cell Death Differ.* 2012 Feb;19(2):257-66.
42. Forloni G, Bertani I, Calella AM, Thaler F, Invernizzi R. Alpha-synuclein and Parkinson's disease: selective neurodegenerative effect of alpha-synuclein fragment on dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *Ann Neurol.* 2000 May;47(5):632-40.
43. Gendreau KL, Hall GF. Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD - New Approaches to a Vexing Problem. *Front Neurol.* 2013 Oct 21;4:160.
44. Giacobini E, Gold G. Alzheimer disease therapy-moving from amyloid- β to tau. *Nat Rev Neurol.* 2013 Dec;9(12):677-86.
45. Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem.* 2001 Jan 26;276(4):2380-6.
46. Giusti-Rodríguez P, Gao J, Gräff J, Rei D, Soda T, Tsai LH. Synaptic deficits are rescued in the p25/Cdk5 model of neurodegeneration by the reduction of β -secretase (BACE1). *J Neurosci.* 2011 Nov 2;31(44):15751-6.
47. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1991 Feb 21;349(6311):704-6.
48. Gómez-Ramos A, Díaz-Hernández M, Cuadros R, Hernández F, Avila J. Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett.* 2006 Sep 4;580(20):4842-50.
49. Greene, L.A., Tischler, A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 73, 2424-2428.
50. Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med.* 1995 Dec;1(12):1291-6.
51. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002 Jul 19;297(5580):353-6.
52. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992 Apr 10;256(5054):184-5.
53. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009 Oct;41(10):1088-93.
54. Hisanaga S-I, Ishiguro K. The kinase activity of Cdk5 and its regulation, in: *Cyclin dependent kinase 5 (Cdk5)*, Ed. Ip NY, Tsai L-H, Springer Science +Business Media LLC, New York 2008
55. Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, Abraham R, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Jones N, Stretton A, Thomas C, Richards A, Ivanov D, Widdowson C, et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2011 May;43(5):429-35.
56. Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G. Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2002 Jun;51(6):783-6.
57. Hsiao YH, Kuo JR, Chen SH, Gean PW. Amelioration of social isolation-triggered onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficit by N-acetylcysteine in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis.* 2012 Mar;45(3):1111-20.
58. Huang E, Qu D, Zhang Y, Venderova K, Haque ME, Rousseaux MW, Slack RS, Woulfe JM, Park DS. The role of Cdk5-mediated apurinic/aprimidinic endonuclease 1 phosphorylation in neuronal death. *Nat Cell Biol.* 2010 Jun;12(6):563-71.
59. Janda E, Isidoro C, Carresi C, Mollace V. Defective autophagy in Parkinson's disease: role of oxidative stress. *Mol Neurobiol.* 2012 Dec;46(3):639-61. doi: 10.1007/s12035-012-8318-1.
60. Jessberger S, Gage FH, Eisch AJ, Lagace DC. Making a neuron: Cdk5 in embryonic and adult neurogenesis. *Trends Neurosci.* 2009 Nov;32(11):575-82.
61. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature.* 2012 Aug 2;488(7409):96-9.
62. Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Aug 19;10(9):698-712.
63. Kazmierczak A, Strosznajder JB, Adamczyk A. alpha-Synuclein enhances secretion and toxicity of amyloid beta peptides in PC12 cells. *Neurochem Int.* 2008 Dec;53(6-8):263-9.

64. Kaźmierczak A, Adamczyk A, Benigna-Strosznajder J. Znaczenie zewnątrzkomórkowej α -synukleiny w molekularnych mechanizmach śmierci komórek. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2013 Nov 4;67:1047-57.
65. Kaźmierczak A, Czapski GA, Adamczyk A, Gajkowska B, Strosznajder JB. A novel mechanism of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) neurotoxicity. Interplay between p53 protein and cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5). *Neurochem Int*. 2011 Feb;58(2):206-14.
66. Kim EM, Elliot JJ, Hobson P, O'Hare E. Effects of intrahippocampal NAC 61-95 injections on memory in the rat and attenuation with vitamin E. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009 Aug 31;33(6):945-51.
67. Knaryan VH, Samantaray S, Park S, Azuma M, Inoue J, Banik NL. SNJ-1945, a calpain inhibitor, protects SH-SY5Y cells against MPP+ and rotenone. *J Neurochem*. 2013. [w druku].
68. Ko J, Humbert S, Bronson RT, Takahashi S, Kulkarni AB, Li E, Tsai LH. p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J Neurosci*. 2001 Sep 1;21(17):6758-71.
69. Krishnan S, Chi EY, Wood SJ, Kendrick BS, Li C, Garzon-Rodriguez W, Wypych J, Randolph TW, Narhi LO, Biere AL, Citron M, Carpenter JF. Oxidative dimer formation is the critical rate-limiting step for Parkinson's disease alpha-synuclein fibrillogenesis. *Biochemistry*. 2003 Jan 28;42(3):829-37.
70. Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2007 Jan 24;27(4):796-807.
71. Lai KO, Ip NY. Recent advances in understanding the roles of Cdk5 in synaptic plasticity. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Aug;1792(8):741-5.
72. Lalioti V, Pulido D, Sandoval IV. Cdk5, the multifunctional surveyor. *Cell Cycle*. 2010 Jan 15;9(2):284-311.
73. Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009 Oct;41(10):1094-9.
74. Larson ME, Lesné SE. Soluble A β oligomer production and toxicity. *J Neurochem*. 2012 Jan;120 Suppl 1:125-39.
75. Lee HJ, Patel S, Lee SJ. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci*. 2005 Jun 22;25(25):6016-24.
76. Lee JH, Kim HS, Lee SJ, Kim KT. Stabilization and activation of p53 induced by Cdk5 contributes to neuronal cell death. *J Cell Sci*. 2007 Jul 1;120(Pt 13):2259-71.
77. Lee MS, Kao SC, Lemere CA, Xia W, Tseng HC, Zhou Y, Neve R, Ahljianian MK, Tsai LH. APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *J Cell Biol*. 2003 Oct 13;163(1):83-95.
78. Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*. 2000 May 18;405(6784):360-4.
79. Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, Spoerri L, Ciccotosto GD, Wright DK, Wong BX, Adlard PA, Cherny RA, Lam LQ, Roberts BR, Volitakis I, Egan GF, McLean CA, Cappai R, Duce JA, Bush AI. Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nat Med*. 2012 Jan 29;18(2):291-5.
80. Leutz S, Steiner B, Marques CA, Haass C, Müller WE, Eckert A. Reduction of trophic support enhances apoptosis in PC12 cells expressing Alzheimer's APP mutation and sensitizes cells to staurosporine-induced cell death. *J Mol Neurosci*. 2002 Jun;18(3):189-201.
81. Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*. 1990 Jun 1;248(4959):1124-6.
82. Li H, Wetten S, Li L, St Jean PL, Upmanyu R, i wsp. Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2008 Jan;65(1):45-53.
83. Li T, Chalifour LE, Paudel HK. Phosphorylation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent protein kinase 5 during nerve growth factor-induced PC12 cell differentiation. *J Biol Chem*. 2007 Mar 2;282(9):6619-28.
84. Liu G, Wang P, Li X, Li Y, Xu S, Uéda K, Chan P, Yu S. Alpha-synuclein promotes early neurite outgrowth in cultured primary neurons. *J Neural Transm*. 2013 Sep;120(9):1331-43.
85. Lopes JP, Agostinho P. Cdk5: multitasking between physiological and pathological conditions. *Prog Neurobiol*. 2011 Jun;94(1):49-63.
86. Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P. Neurodegeneration in an Abeta-induced model of Alzheimer's disease: the role of Cdk5. *Aging Cell*. 2010 Feb;9(1):64-77.

87. Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P. Role of cyclin-dependent kinase 5 in the neurodegenerative process triggered by amyloid-Beta and prion peptides: implications for Alzheimer's disease and prion-related encephalopathies. *Cell Mol Neurobiol*. 2007 Nov;27(7):943-57.
88. Lu Y, Li T, Qureshi HY, Han D, Paudel HK. Early growth response 1 (Egr-1) regulates phosphorylation of microtubule-associated protein tau in mammalian brain. *J Biol Chem*. 2011 Jun 10;286(23):20569-81.
89. Mateo I, Vázquez-Higuera JL, Sánchez-Juan P, Rodríguez-Rodríguez E, Infante J, García-Gorostiaga I, Berciano J, Combarros O. Epistasis between tau phosphorylation regulating genes (CDK5R1 and GSK-3beta) and Alzheimer's disease risk. *Acta Neurol Scand*. 2009 Aug;120(2):130-3.
90. Medeiros R, Kitazawa M, Chabrier MA, Cheng D, Baglietto-Vargas D, Kling A, Moeller A, Green KN, LaFerla FM. Calpain inhibitor A-705253 mitigates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline in aged 3xTgAD mice. *Am J Pathol*. 2012 Aug;181(2):616-25.
91. Morfini G, Szebenyi G, Brown H, Pant HC, Pigino G, DeBoer S, Beffert U, Brady ST. A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO J*. 2004 Jun 2;23(11):2235-45.
92. Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L. The many faces of tau. *Neuron*. 2011 May 12;70(3):410-26.
93. Murayama, K., Singh, N.N., Helmrich, A., Barnes, D.W. (2001) Neural Cell Lines. In *Protocols for neural cell culture*. (Doerin, L.C., ed) pp 219. Springer Science and Business Media LLC. New York, 2008.
94. Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan BN, Buross J, Gallins PJ, Buxbaum JD, Jarvik GP, Crane PK, Larson EB, Bird TD, Boeve BF, Graff-Radford NR, De Jager PL, Evans D, Schneider JA, et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2011 May;43(5):436-41.
95. Nakamura S, Kawamoto Y, Nakano S, Akiguchi I, Kimura J. p35nck5a and cyclin-dependent kinase 5 colocalize in Lewy bodies of brains with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 1997 Aug;94(2):153-7.
96. Neystat M, Rzhetskaya M, Oo TF, Kholodilov N, Yarygina O, Wilson A, El-Khodor BF, Burke RE. Expression of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 in models of induced apoptotic death in neurons of the substantia nigra in vivo. *J Neurochem*. 2001 Jun;77(6):1611-25.
97. Noble W, Hanger DP, Miller CC, Lovestone S. The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front Neurol*. 2013 Jul 1;4:83.
98. O'Hare E, Elliott JJ, Hobson P, Spanswick D, Kim EM. Behavioural deterioration induced by intrahippocampal NAC61-95 injections and attenuation with ibuprofen. *Behav Brain Res*. 2010 Mar 17;208(1):274-7.
99. Ohshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Veeranna, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarni AB. Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 1;93(20):11173-8.
100. Park J, Jang M, Chang S. Deleterious effects of soluble amyloid- β oligomers on multiple steps of synaptic vesicle trafficking. *Neurobiol Dis*. 2013 Jul;55:129-39.
101. Park JY, Paik SR, Jou I, Park SM. Microglial phagocytosis is enhanced by monomeric alpha-synuclein, not aggregated alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease. *Glia*. 2008 Aug 15;56(11):1215-23.
102. Patrick GN, Zhou P, Kwon YT, Howley PM, Tsai LH. p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 1998 Sep 11;273(37):24057-64.
103. Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):615-22.
104. Piedrahita D, Hernández I, López-Tobón A, Fedorov D, Obara B, Manjunath BS, Boudreau RL, Davidson B, Laferla F, Gallego-Gómez JC, Kosik KS, Cardona-Gómez GP. Silencing of CDK5 reduces neurofibrillary tangles in transgenic Alzheimer's mice. *J Neurosci*. 2010 Oct 20;30(42):13966-76.
105. Preece P, Virley DJ, Costandi M, Coombes R, Moss SJ, Mudge AW, Jazin E, Cairns NJ. Beta-secretase (BACE) and GSK-3 mRNA levels in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003 Aug 19;116(1-2):155-8.
106. Qu D, Rashidian J, Mount MP, Aleyasin H, Parsanejad M, Lira A, Haque E, Zhang Y, Callaghan S, Daigle M, Rousseaux MW, Slack RS, Albert PR, Vincent I, Woulfe JM, Park DS. Role of Cdk5-mediated phosphorylation of Prx2 in MPTP toxicity and Parkinson's disease. *Neuron*. 2007 Jul 5;55(1):37-52.
107. Qu J, Nakamura T, Cao G, Holland EA, McKercher SR, Lipton SA. S-Nitrosylation activates Cdk5 and contributes to synaptic spine loss induced by beta-amyloid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 23;108(34):14330-5.

108. Rademakers R, Sleegers K, Theuns J, Van den Broeck M, Bel Kacem S, Nilsson LG, Adolfsson R, van Duijn CM, Van Broeckhoven C, Cruts M. Association of cyclin-dependent kinase 5 and neuronal activators p35 and p39 complex in early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2005 Aug-Sep;26(8):1145-51.
109. Reddy PH. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2011 Sep 30;1415:136-48. Reiman EM, Webster JA, Myers AJ, i wsp.. GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. *Neuron*. 2007 Jun 7;54(5):713-20.
110. Roselli F, Livrea P, Almeida OF. CDK5 is essential for soluble amyloid β -induced degradation of GKAP and remodeling of the synaptic actin cytoskeleton. *PLoS One*. 2011;6(7):e23097.
111. Sadleir KR, Vassar R. Cdk5 protein inhibition and A β 42 increase BACE1 protein level in primary neurons by a post-transcriptional mechanism: implications of CDK5 as a therapeutic target for Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2012 Mar 2;287(10):7224-35.
112. Salińska E, Łazarewicz JW. Rola wapnia w fizjologii i patologii neuronów. *Postepy Biochem*. 2012;58(4):403-17.
113. Sengupta A, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Singh TJ. Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol Cell Biochem*. 1997 Feb;167(1-2):99-105.
114. Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M, Bis JC, Smith AV, Carassquillo MM, Lambert JC, Harold D, Schrijvers EM, Ramirez-Lorca R, Debette S, Longstreth WT Jr, et al. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*. 2010 May 12;303(18):1832-40.
115. Shukla V, Zheng YL, Mishra SK, Amin ND, Steiner J, Grant P, Kesavapany S, Pant HC. A truncated peptide from p35, a Cdk5 activator, prevents Alzheimer's disease phenotypes in model mice. *FASEB J*. 2013 Jan;27(1):174-86.
116. Small SA, Duff K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron*. 2008 Nov 26;60(4):534-42.
117. Smith PD, Crocker SJ, Jackson-Lewis V, Jordan-Sciutto KL, Hayley S, Mount MP, O'Hare MJ, Callaghan S, Slack RS, Przedborski S, Anisman H, Park DS. Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 11;100(23):13650-5.
118. Smith PD, Mount MP, Shree R, Callaghan S, Slack RS, Anisman H, Vincent I, Wang X, Mao Z, Park DS. Calpain-regulated p35/cdk5 plays a central role in dopaminergic neuron death through modulation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. *J Neurosci*. 2006 Jan 11;26(2):440-7.
119. Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci*. 2005 Aug;8(8):1051-8.
120. Spires-Jones TL, Meyer-Luehmann M, Osetek JD, Jones PB, Stern EA, Bacskai BJ, Hyman BT. Impaired spine stability underlies plaque-related spine loss in an Alzheimer's disease mouse model. *Am J Pathol*. 2007 Oct;171(4):1304-11.
121. Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS, Goldstein LS. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science*. 2005 Feb 25;307(5713):1282-8.
122. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 1;90(5):1977-81.
123. Strocchi P, Pession A, Dozza B. Up-regulation of cDK5/p35 by oxidative stress in human neuroblastoma IMR-32 cells. *J Cell Biochem*. 2003 Mar 1;88(4):758-65.
124. Sultan A, Nesslany F, Violet M, Bégard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC. Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem*. 2011 Feb 11;286(6):4566-75.
125. Sundaram JR, Poore CP, Sulaimi NH, Pareek T, Asad AB, Rajkumar R, Cheong WF, Wenk MR, Dawe GS, Chuang KH, Pant HC, Kesavapany S. Specific inhibition of p25/Cdk5 activity by the Cdk5 inhibitory peptide reduces neurodegeneration in vivo. *J Neurosci*. 2013 Jan 2;33(1):334-43.
126. Takahashi M, Iseki E, Kosaka K. Cdk5 and munc-18/p67 co-localization in early stage neurofibrillary tangles-bearing neurons in Alzheimer type dementia brains. *J Neurol Sci*. 2000 Jan 1;172(1):63-9.
127. Takahashi M, Iseki E, Kosaka K. Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) associated with Lewy bodies in diffuse Lewy body disease. *Brain Res*. 2000 Apr 17;862(1-2):253-6.

128. Tanaka S, Takehashi M, Matoh N, Iida S, Suzuki T, Futaki S, Hamada H, Masliah E, Sugiura Y, Ueda K. Generation of reactive oxygen species and activation of NF-kappaB by non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid. *J Neurochem.* 2002 Jul;82(2):305-15.
129. Taniguchi S, Fujita Y, Hayashi S, Kakita A, Takahashi H, Murayama S, Saido TC, Hisanaga S, Iwatsubo T, Hasegawa M. Calpain-mediated degradation of p35 to p25 in postmortem human and rat brains. *FEBS Lett.* 2001 Jan 26;489(1):46-50.
130. Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Oct 1;2(10).
131. Taschenberger G, Toloe J, Tereshchenko J, Akerboom J, Wales P, Benz R, Becker S, Outeiro TF, Looger LL, Bähr M, Zweckstetter M, Kügler S. β -synuclein aggregates and induces neurodegeneration in dopaminergic neurons. *Ann Neurol.* 2013 Jul;74(1):109-18.
132. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.* 1991 Oct;30(4):572-80.
133. Town T, Zolton J, Shaffner R, Schnell B, Crescentini R, Wu Y, Zeng J, DelleDonne A, Obregon D, Tan J, Mullan M. p35/Cdk5 pathway mediates soluble amyloid-beta peptide-induced tau phosphorylation in vitro. *J Neurosci Res.* 2002 Aug 1;69(3):362-72.
134. Tseng HC, Zhou Y, Shen Y, Tsai LH. A survey of Cdk5 activator p35 and p25 levels in Alzheimer's disease brains. *FEBS Lett.* 2002 Jul 17;523(1-3):58-62.
135. Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 1;90(23):11282-6.
136. Vázquez-Higuera JL, Mateo I, Sánchez-Juan P, Rodríguez-Rodríguez E, Infante J, Berciano J, Combarros O. No association of CDK5 genetic variants with Alzheimer's disease risk. *BMC Med Genet.* 2009 Jul 17;10:68.
137. Wen Y, Planel E, Herman M, Figueroa HY, Wang L, Liu L, Lau LF, Yu WH, Duff KE. Interplay between cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 beta mediated by neuregulin signaling leads to differential effects on tau phosphorylation and amyloid precursor protein processing. *J Neurosci.* 2008 Mar 5;28(10):2624-32.
138. Wen Y, Yu WH, Maloney B, Bailey J, Ma J, Marié I, Maurin T, Wang L, Figueroa H, Herman M, Krishnamurthy P, Liu L, Planel E, Lau LF, Lahiri DK, Duff K. Transcriptional regulation of beta-secretase by p25/cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing. *Neuron.* 2008 Mar 13;57(5):680-90.
139. Wilkaniec A, Strosznajder JB, Adamczyk A. Toxicity of extracellular secreted alpha-synuclein: Its role in nitrosative stress and neurodegeneration. *Neurochem Int.* 2013 Apr;62(5):776-83.
140. Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life.* 2008 Sep;60(9):575-90.
141. Wong AS, Lee RH, Cheung AY, Yeung PK, Chung SK, Cheung ZH, Ip NY. Cdk5-mediated phosphorylation of endophilin B1 is required for induced autophagy in models of Parkinson's disease. *Nat Cell Biol.* 2011 May;13(5):568-79.
142. Wu H, Lozano G. NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J Biol Chem.* 1994 Aug 5;269(31):20067-74.
143. Zhang J, Krishnamurthy PK, Johnson GV. Cdk5 phosphorylates p53 and regulates its activity. *J Neurochem.* 2002 Apr;81(2):307-13.
144. Zhang L, Liu W, Szumlanski KK, Lew J. p10, the N-terminal domain of p35, protects against CDK5/p25-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Dec 4;109(49):20041-6.
145. Zhang P, Yu PC, Tsang AH, Chen Y, Fu AK, Fu WY, Chung KK, Ip NY. S-nitrosylation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) regulates its kinase activity and dendrite growth during neuronal development. *J Neurosci.* 2010 Oct 27;30(43):14366-70.
146. Zheng YL, Amin ND, Hu YF, Rudrabhatla P, Shukla V, Kanungo J, Kesavapany S, Grant P, Albers W, Pant HC.10.1523/JNEUROSCI.3637-10.2010. A 24-residue peptide (p5), derived from p35, the Cdk5 neuronal activator, specifically inhibits Cdk5-p25 hyperactivity and tau hyperphosphorylation. : *J Biol Chem.* 2010 Oct 29;285(44):34202-12.
147. Żekanowski C, Wojda U. Aneuploidy, chromosomal missegregation, and cell cycle reentry in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2009;69(2):232-53.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

5.1. Publikacje – analiza bibliometryczna

Prace opublikowane łącznie (w całym dorobku):

1.	Artykuły oryginalne w czasopismach indeksowanych	21
2.	Artykuły przeglądowe w czasopismach indeksowanych	2
3.	Artykuły oryginalne w czasopismach nieindeksowanych	1
4.	Artykuły przeglądowe w czasopismach nieindeksowanych	-
5.	Monografie i rozdziały w książkach; wydawnictwa zbiorowe zarejestrowane pod nr ISBN	1
6.	Sumaryczny IF (wg Journal Citation Reports, zgodnie z rokiem opublikowania)	64,392
7.	Całkowita liczba cytowań (wg bazy Web of Science)	200
8.	Index Hirscha (wg bazy Web of Knowledge)	9

Wykaz wszystkich opublikowanych prac znajduje się w załączniku nr 4.

Szczegółowa analiza bibliometryczna wykonana przez Bibliotekę IMDiK PAN znajduje się w załączniku nr 10.

Szczegółowy opis pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych znajduje się w załączniku nr 7.

5.2. Nagrody i wyróżnienia

2005 Wyróżnienie pracy doktorskiej przyznane przez Radę Naukową Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa, październik 2005

2011 Członkostwo Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w kadencji 2011-2014, przedstawiciel młodej kadry naukowej

2011 Nagroda naukowa Dyrektora IMDiK dla zespołu: dr Agata Adamczyk A, dr Anna Kaźmierczak, dr **Grzegorz A. Czapski**, prof. Joanna B. Strosznajder za publikację „Alpha-synuclein induced cell death in mouse hippocampal (HT22) cells is mediated by nitric oxide-dependent activation of caspase-3” FEBS Letters 2010, 584, 3504-3508. Warszawa, 9 grudnia 2011

2012 Zespołowa nagroda naukowa Wydziału Nauk Medycznych PAN dla zespołu dr hab. Agacie Adamczyk prof. IMDiK, prof. dr hab. Joannie B. Strosznajder, dr Annie Wilkaniec i dr **Grzegorzowi A. Czapskiemu** oraz prof. dr hab. Barbarze Gajkowskiej za cykl prac pt. „Udział

alfa-synukleiny oraz peptydów NAC w molekularnych mechanizmach obumierania komórek. Znaczenie w chorobach neurodegeneracyjnych.” Warszawa, 6 grudnia 2012

2012 Nagroda naukowa Dyrektora IMDIK dla zespołu: dr **Grzegorz A. Czapski**, dr Magdalena Gąssowska, dr Martyna Songin, prof. Joanna B. Strosznajder za publikację “Alterations of cyclin dependent kinase 5 expression and phosphorylation in amyloid precursor protein (APP)-transfected PC12 cells” FEBS Lett. 2011, 585: 1243-1248. Warszawa, 7 grudnia 2012

Dofinansowania udziału w konferencjach naukowych uzyskane w postaci grantów podróży:

2002 stypendium IBRO umożliwiające uczestnictwo w konferencji 4th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, Tatranska Lomnica – Stara Lesna, Słowacja, 22-25 września, 2002

2004 stypendium ISN umożliwiające uczestnictwo w konferencji 6th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry (APSN) Hong Kong 4-7 lutego 2004

2004 stypendium ISN umożliwiające uczestnictwo w kursie 6th Biennial ISN Course, The Advanced School of Neurochemistry “Responses to Trauma in the CNS: Genes to Ethics” Palais des Papes, Awinion, Francja 11-13 maja, 2004

2004 stypendium ISN umożliwiające uczestnictwo w konferencji The 1th Special Neurochemistry Conference “Changes in neuronal gene expression and CNS drug responses” Palais des Papes, Awinion, Francja 13-16 maja, 2004

2004 stypendium Fundacja Nauki Polskiej umożliwiające uczestnictwo w konferencji 4th Forum of European Neuroscience, Lisbona, Portugalia 10-14 lipca 2004

2005 stypendium IBRO umożliwiające uczestnictwo w konferencji 5th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, Tatranska Lomnica – Stara Lesna, Słowacja, 18-23 września 2005

2005 stypendium Programu Marii Curie-Skłodowskiej Komisji Europejskiej umożliwiające uczestnictwo w konferencji 13th Euroconference on Apoptosis "Survival At The Danube", Budapeszt, Węgry, 01 –04 października 2005

2007 stypendium ISN umożliwiające uczestnictwo w kursie 8th Biennial ISN Course, The Advanced School Of Neurochemistry “Neurodegenerative conditions: Causes & Cures”, Valladolid, Meksyk, 15-19 sierpnia 2007

2007 stypendium Polskiej Sieci Biologii Komórkowej I Molekularnej umożliwiające uczestnictwo w konferencji 21st Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry ISN-ASN, Cancun, Meksyk 19-24 sierpnia 2007

2008 stypendium Alzheimer’s Association umożliwiające uczestnictwo w konferencji International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) „Alzheimer's Association

International Conference on Alzheimer's Disease 2008", Chicago, Stany Zjednoczone 26-31 lipca 2008

2009 stypendium ISN umożliwiające uczestnictwo w konferencji 22nd Biennial Meeting of the ISN/APSNI Joint Meeting, Busan, Korea Południowa, 23-29 sierpnia 2009

2011 stypendium Alzheimer's Association umożliwiające uczestnictwo w konferencji International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) „Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2011”, Paryż, Francja, 16-21 lipca 2011

5.3. Staże badawcze

styczeń-maj 2000	Department of Biochemistry of Lipids, Centre for Biomembranes and Lipid Enzymology, Utrecht University, The Netherlands
styczeń-marzec 2003	Department of Biochemistry of Lipids, Centre for Biomembranes and Lipid Enzymology, Utrecht University, The Netherlands

5.4. Udział w projektach naukowych

1. 2003-2004 Projekt badawczy – promotorski MNIł 3 PO5A 110 25
"Udział tlenu azotu i peroksyazotynu w uszkodzeniu mózgu w stresie oksydacyjnym wywołanym lipopolisacharydem"
kierownik projektu - prof. dr hab. Joanna B. Strosznajder
charakter udziału w projekcie – główny wykonawca
2. 2003-2006 Projekt badawczy zamawiany MNIł PBZ-MIN-001/PO5/16
"Tlenek azotu - jego specyficzna rola w obumieraniu neuronów: związek przyczynowy schorzeń otępiennych. Związana z wiekiem i Ab zmiana ekspresji genów poszczególnych izoform NOS w różnych częściach mózgu. Rola NO w degeneracji synaps."
kierownik projektu - prof. dr hab. Joanna B. Strosznajder
charakter udziału w projekcie – główny wykonawca
3. 2005-2008 Projekt badawczy własny MNIł 2P05A 041 29
„Znaczenie alfa-synukleiny w zaburzeniu funkcji mitochondriów z uwzględnieniem białek pro- i antyapoptotycznych z rodziny Bcl2”
kierownik projektu - dr Agata Adamczyk
charakter udziału w projekcie – główny wykonawca
4. 2007-2008 Sieć naukowa 28/E-32/SN-0053/2007
„Farmakologiczna i genetyczna protekcja oraz cytoprotekcja w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego”
koordynator projektu - prof. dr hab. Joanna Strosznajder
charakter udziału w projekcie – główny wykonawca

5. 2008-2009 Sieć naukowa 28/E-32/SN-0053/2008
„Farmakologiczna i genetyczna protekcja oraz cytoprotekcja w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego”
koordynator projektu - prof. dr hab. Joanna Strosznajder
charakter udziału w projekcie – główny wykonawca
6. 2008-2010 Projekt badawczy własny N N401 014635
„Rola kinaz cyklinozależnych w molekularnych mechanizmach choroby Alzheimera”
charakter udziału w projekcie – kierownik projektu
7. 2012-2015 Projekt badawczy z zakresu badań podstawowych - OPUS 2011/03/B/NZ3/04549
„Analiza udziału CDK5 w procesach zapalnych w eksperymentalnym modelu choroby Alzheimera „
charakter udziału w projekcie – kierownik projektu
8. 2013-2016 projekt badawczy z zakresu badań podstawowych - OPUS 2012/05/B/NZ3/02047
„Udział Parkiny w molekularnych mechanizmach śmierci komórek wywołanej egzogenną alfa-synukleiną. Znaczenie w chorobie Parkinsona i innych synukleinopatiach”
kierownik grantu - dr hab. Agata Adamczyk prof. IMDiK PAN
charakter udziału w projekcie – główny wykonawca
9. 2014-2017 projekt badawczy z zakresu badań podstawowych – OPUS 2013/09/B/NZ3/01350
„Znaczenie polimerazy poli(ADP-rybozy) i sirtuin w regulacji śmierci komórek. Nowe punkty uchwytu w terapii choroby Alzheimera.”
kierownik projektu - prof. dr hab. n med. Joanna B. Strosznajder
charakter udziału w projekcie – główny wykonawca

Udział w innych projektach:

1. Inwestycyjny Program Wspierania Infrastruktury Badawczej w ramach Funduszu Nauki i Technologii Polskiej „Aparatura naukowo-badawcza do analizy komórek metodą cytometrii przepływowej” (600 000 zł) IMDiK PAN, Warszawa, 2011

5.5. Wykłady

Wykłady na zaproszenie:

1. „Funkcja układu glutaminianergicznego w fizjologii o.u.n. i stanach zapalnych” Wykład dla studentów Studium Doktoranckiego Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie, 2005 r.
2. „Stres oksydacyjny w patofizjologii komórki” Wykład dla studentów Studium Doktoranckiego Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie, 2006 r.

3. „Znaczenie wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w patomechanizmie chorób neurodegeneracyjnych” Wykład dla studentów Studium Doktoranckiego Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie, 2012 r.

5.6. Udział w konferencjach

Autorstwo lub współautorstwo ponad 90 komunikatów na konferencjach naukowych krajowych i zagranicznych.

Lista najważniejszych komunikatów zjazdowych prezentowanych osobiście znajduje się w załączniku nr 4.

5.7. Recenzowanie artykułów i projektów

Recenzowanie artykułów dla czasopism:

Folia Neuropathologica
Acta Neurobiologiae Experimentalis
Neurotoxicity Research
Neurochemical Research
Neuroscience
Pharmacological Research
Molecular Neurobiology

5.8. Osiągnięcia dydaktyczne i popularyzatorskie

5.8.1. Opieka naukowa i dydaktyczna nad studentami (Warszawski Uniwersytet Medyczny, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Politechnika Warszawska, Uniwersytet Warszawski) realizującymi prace magisterskie w Zakładzie Komórkowej Transdukcji Sygnału IMDIK PAN:

- 9 wykonanych prac magisterskich (praca pt. „Badanie właściwości cytoprotekcyjnych i antyapoptotycznych frakcji alkaloidowych izolowanych z *Huperzia selago* i *Lycopodium clavatum* oraz wybranych alkaloidów wzorcowych” wykonana we współpracy z Zakładem Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej WUM otrzymała w 2013 roku I nagrodę w L Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej WUM w kategorii Lek Pochodzenia Naturalnego)
- 1 praca w toku

5.8.2. Opieka naukowa i dydaktyczna nad studentami odbywającymi praktyki wakacyjne w Zakładzie Komórkowej Transdukcji Sygnału IMDiK PAN

5.8.3. Przewodniczenie Sesji Sprawozdawczej II I III roku Studiów Doktoranckich IMDiK PAN, 10 czerwca 2008

5.8.4. Prezentowanie 28 marca 2012 r. na posiedzeniu plenarnym Rady Naukowej IMDiK PAN publikacji pt. „**A novel mechanism of non-A β component of Alzheimer’s disease amyloid (NAC) neurotoxicity. Interplay between p53 protein and cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5).**” **Kaźmierczak A, Czapski GA, Adamczyk A, Gajkowska B, Strosznajder JB. *Neurochemistry International* 2011,58:206-214.**, zaliczonej do grupy 5 najważniejszych osiągnięć naukowych IMDiK PAN w 2011 r.

5.9. Członkostwo w towarzystwach naukowych

Polskie Towarzystwo Alzheimerowskie, członek

Polskie Towarzystwo Badań Układu Nerwowego, członek

5.10. Organizacja konferencji naukowych

Członkostwo komitetu organizacyjnego:

1. IMDiK PAN – 2005
20th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry - Satellite symposium “Molecular basis for signal transduction in neurodegeneration and neuroregeneration”, Warsaw, August 27–30, 2005.
2. IMDiK PAN – 2007
8th Neurochemical Conference “Biochemical and genetic basis of neurological diseases and novel therapeutic approaches” Warsaw, October 25-26, 2007.
3. IMDiK PAN – 2009
Neurochemical Conference 2009 “Genetic and molecular biochemistry of neurological disease in experiment and clinic. Neuroprotective strategy.”, Warszawa, November 19-20, 2009.
4. IMDiK PAN – 2011
Neurochemical Conference 2011, The Days of Neurochemistry „Genetic and molecular mechanisms of neurological diseases. Progress in diagnosis and therapy.” Warszawa, October 20-21, 2011,

5. IMDIK PAN – 2013

Neurochemical Conference 2013 The Days of Neurochemistry „Emerging topics in neurological diseases: molecular mechanisms, diagnosis and therapy”, Warsaw, October 24-25, 2013.

5.11. Członkostwo w komitetach redakcyjnych czasopism naukowych

Redaktor pomocniczy w specjalnym wydaniu Oxidative Medicine and Cellular Longevity (5-letni IF= 3,740) pt. “Neurodegeneration, Mitochondrial Dysfunction, and Oxidative Stress” Volume 2013 (2013).

Normane 07.03.14

Grzegorz Czapski