

A 9-hidroxi-risperidon kivédi a stressz indukálta β -aktin választ patkány hippocampusban

KÁLMÁN SÁRA¹, PÁKÁSKI MAGDOLNA¹, SZÜCS SZABINA¹, KÁLMÁN JÁNOS IFJ.¹,
FAZEKAS ÖRSIKE¹, SÁNTHA PETRA¹, SZABÓ GYULA², JANKA ZOLTÁN¹ ÉS KÁLMÁN JÁNOS¹

¹ Szegedi Tudományegyetem, Pszichiátriai Klinika, Alzheimer-kór Kutatócsoport, Szeged

² Szegedi Tudományegyetem, Kóréletani Intézet, Szeged

Az Alzheimer-kór (AK) a neurodegeneratív demenciák leggyakoribb formája. Kialakulásának oka, mechanizmusa nem ismert, a legújabb rizikótényezők között szerepel a stressz is. Az AK-ra jellemző neuropatológiai elváltozások kialakulásában az amiloid-prekursor protein (APP) kóros anyagcseréjének, a neurofibrilláris fonatokat alkotó tau-fehérjék hiperfoszforilációjában részt vevő mitogén-aktivált protein kináz (MAPK1) hiperaktivitásának, továbbá a szinaptogenezis, neuronális plaszticitásban szerepet játszó β -aktinnak tulajdonítanak szerepet. Kutatásunk célja az APP, MAPK1, β -aktin gének krónikus stressz indukálta transzkripciós változásainak követése volt patkány kortexben és hippocampusban. Azt is vizsgáltuk, hogy a 9-hidroxi-risperidon (9OHRIS) kezelés a stressz hatással egy időben hogyan módosítja az említett gének transzkripcióját. Felnőtt hím Wistar patkányokat standard immobilizációs stresszkezelésünk 3 héten keresztül. Tápszondán keresztül adott 4 mg/tskg 9OHRIS hatását vizsgálva elkülönítettünk kontroll, stressz, 9OHRIS, stressz- és 9OHRIS kezelt (n=5-6) csoportokat. A perfundált agymintákból real-time PCR-rel mértük a kontroll csoporthoz viszonyított, relatív mRNS mennyiségeket. A 3 hetes stressz kezelés önmagában szignifikáns mértékű β -aktin transzkripció emelkedést okozott a patkány hippocampusban. A stressz indukálta hippocampális β -aktin overexpressziót a 9OHRIS represszálta. Az APP és MAPK1 mRNS-ek expresszióját nem befolyásolta sem a stressz, sem a 9OHRIS kezelés. Eredményeink a stressz indukálta β -aktin transzkripciós válaszra hívják fel a figyelmet patkány hippocampusban. A β -aktin mRNS expresszió változásai a stressz kiváltott neuronális plaszticitási - adaptációs folyamatokkal hozhatók kapcsolatba, melyet a 9OHRIS kezelés módosít. Adataink a második generációs antipszichotikum kedvező hatására utalnak a stressz pathomechanizmusa szempontjából, melynek jelentősége lehet mind az AK, mind a pszichózisok kezelésében.

Kulcsszavak: Alzheimer-kór, stressz, hippocampus, amiloid-prekursor protein, mitogén-aktivált protein kináz, β -aktin, 9-hidroxi-risperidon, real-time PCR

Az Alzheimer-kór (AK) az időskori demenciák leggyakoribb formája. Ma Magyarországon közel 1 millió embert érint közvetve vagy közvetlenül. Kialakulásának oka, pontos mechanizmusa nem ismert, rizikótényezők valószínűsíthetőek, mint az életkor, a koponya trauma, bizonyos genetikai faktorok és újabban hangsúlyozzák a stressz és a stresszel kapcsolatos tényezők szerepét is. Klinikai tünetei két nagy csoportba sorolhatóak: a kognitív tünetek, mint például az emlékezet-, írás-, olvasászavar, az exekutív működések zavara, valamint a viselkedési és

pszichés tünetek (BPSD /Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia/). A BPSD szindróma részét képezik az affektív zavarok, szorongás, pszichózis, agitáció és agresszivitás.

Az AK-ra jellemző neuropatológiai elváltozások, mint a szenilis plakkok (SP), a neurofibrilláris fonadékok (NFT), és a Hirano-testek (HB), már akár évtizedekkel a klinikai tünetek megjelenése előtt kialakulnak a betegek agyában. A SP főként a kortikális és hippocampális területeken figyelhető meg, kialakulásáért az amiloid-prekursor protein (APP) kóros

hasításának eredményeként létrejövő β -amiloidot (A β) teszik felelőssé (Pákáski és Kálmán, 2008). Az APP transzmembrán glükoprotein, feladata még nem egyértelműen tisztázott, de szerepét feltételezik többek között a szinaptogenezis és a tanulás folyamatában, arra alapozva, hogy különösen nagy sűrűségben található meg a szinaptikus membránokban. A fehérjét a neuronokban jelenlévő szekretázok hasítják: az α -szekretáz normál helyen, a β - és γ -szekretáz patológiásan (De Strooper, 2003). A kóros hasítás eredménye a 40-42 aminosav hosszú, főként az APP extracelluláris részét tartalmazó A β , mely a SP fő alkotója. Az A β megemelkedett mennyiségét ezen kívül kapcsolatba hozzák a long-term potentiation (LTP) AK-ra is jellemző gyengülésével, ami a szinapszisok számának csökkenéséhez vezet (Zetterberg és mtsai, 2010).

A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) enzimszámú tagjainak szerepet tulajdonítanak az AK-ra és más neurodegeneratív betegségekre is jellemző, az agyban lejátszódó gyulladásos folyamatokban, valamint a glutamát excitotoxicitásban is. Ezen kívül kulcsszerepet játszanak az AK-ban megfigyelhető patológiás tau hiperfoszforilációban is (Zhu és mtsai, 2000).

A tau-proteinek feladata a mikrotubulusok stabilizációja, ezáltal a citoskeleton összerendezése. A foszfatázok és kinázok egyensúlyának eltolódása okozza a tau hiperfoszforilációt, ezáltal a citoskeletális funkcióvesztést és a következményes fehérje aggregációt. Ez a neuron intracelluláris transzport folyamatainak sérüléséhez, axondegenerációhoz és NFT kialakuláshoz vezet az AK folyamata során (Shahani és Brandt, 2002).

A HB nem AK-specifikus neuropatológiai elváltozás, megjelenik például Parkinson-kórban is. A főként aktint tartalmazó aggregátum leginkább a hippokampusz piramis-sejtjeiben fordul elő (Hirano, 1994). Az aktin a mikrofilamentumok felépítője, egyik nem-muszkuláris izoformája a β -aktin, mely az idegsejtekben is megtalálható. Az aktin monomerekből felépülő hálózatok szerepet játszanak az intracelluláris transzport folyamatokban, az új dendrit tüskék kialakulásában és a meglévők átépülésében, így a szinaptogenezis, a tanulás folyamatában (Sekino és mtsai, 2007). Vizsgálatok szerint az aktin polimerizáció gátlása (Fukazawa és mtsai, 2003), vagy az agyi neurotrofikus faktor (BDNF /brain-derived neurotrophic factor/) szignál blokája önmagában gátolja az LTP létrejöttét és így a szinaptikus plaszticitást (Rex és mtsai, 2007).

A depresszió, a stressz és az AK közötti összefüggést számos kutatás bizonyította kísérletes és epidemiológiai

oldalról (Wilson és mtsai, 2002), azonban a pontos molekuláris mechanizmus még nem ismert. A stressz bizonyítottan csökkenti a LTP kialakulását, részben azáltal, hogy a megemelkedett glükokortikoid szint csökkenti a BDNF szintjét a tanulás szempontjából kulcsfontosságú kortikális és hippokampális területeken (Smith és mtsai, 1995). A hosszan tartó magas kortizol szint neurodegenerációhoz, csökkent neurogenézishez, a dendrit tüskék és a szinapszisok számának csökkenéséhez vezet a hippokampuszban (Heuser és Lammers, 2003), így tehát a krónikus stressz negatív hatással van a hippokampusz-függő tanulásra. További kapcsolatokra utal, hogy AK-ban ismert a CRH szint csökkenése és a CRH receptorok számának kompenzatorikus emelkedése a kortikális területeken (Behan és mtsai, 1996).

Jelen kutatásaink célja annak vizsgálata volt, hogy a krónikus stressz kezelés hatással van-e a tanulással és neurodegenerációval is összefüggő APP, MAPK1, β -aktin gének expressziójára patkány kortexben és hippokampuszban. Arra is kíváncsiak voltunk, hogy az atípusos antipszichotikum, 9-hidroxi-risperidon (9OHRIS, paliperidon) kezelés milyen hatással van ezen folyamatokra.

MÓDSZEREK

Vizsgálati csoportok

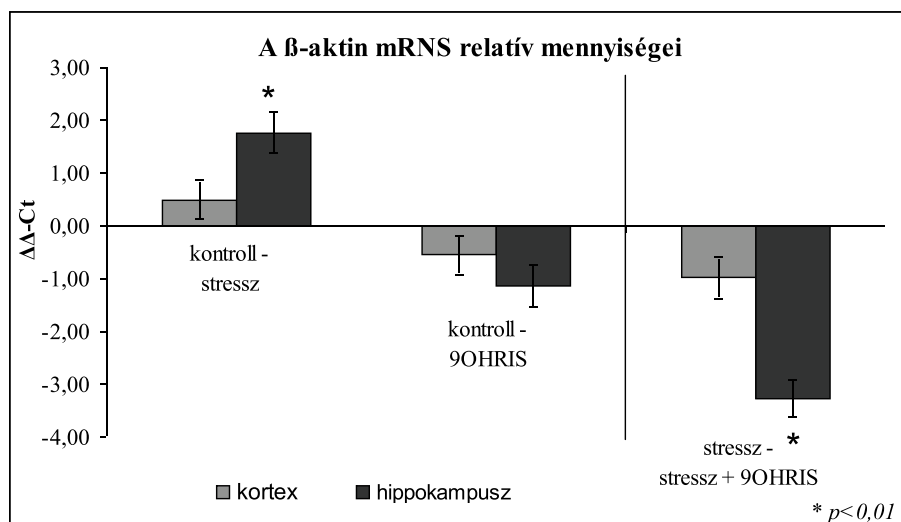
Kísérleteinket felnőtt, 250-300 grammos, hím Wistar patkányokon végeztük. Az állatok standard körülmények között voltak tartva: állandó hőmérsékleten, 12 órás világosság-sötétség periódusok, szabad víz és élelem hozzáféréssel.

Négy vizsgálati csoportot különítettünk el: (1) Voltak kontroll állatok, melyek semmilyen kezelést nem kaptak (n=5). (2) Az állatok egyik csoportja (n=5) standard krónikus immobilizációs stressz kezelést kapott 21 napon keresztül (5 h/nap) (Pitman és mtsai, 1988). (3) A másik csoport (n=6) gyomorszondán át 9OHRIS kezelést kapott szintén 21 napig, 4 mg/testsúly kg dózisban (Kline és mtsai, 2007). (4) Végül a negyedik csoport mind immobilizációs stressz kezelést, mind 9OHRIS kezelést kapott egy időben szintén 21 napon keresztül (n=6).

A kísérlethez a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága adott etikai engedélyt.

Mintavétel

Intraperitoneálisan adott 10%-os klorálhidráttal történő altatásban, 2-4 °C-os fiziológiás sóoldattal

1. ábra. A β -aktin mRNS relatív mennyiségei

Az első két oszlopban a kontroll állatokhoz viszonyított relatív mRNS mennyiség látható, míg a harmadik oszlopban a krónikus immobilizációs stressz kezelést kapott állatokhoz viszonyított érték van feltüntetve. (9OHRIS – 9-hidroxi-risperidon)

végzett transzkardiális perfúziót követően mindkét hemiszfériumot eltávolítottuk, majd mintát vettünk a frontális kortexből és a hippokampuszból. A mintákat felhasználásra kerülésig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Totál RNS izolálás

A frontális kortexből és hippokampuszból vett mintákból teljes sejt RNS-t izoláltunk (Macherey-Nagel; NucleoSpin II protokoll alapján): 30 mg agyszövetet 350 μl RA1 pufferrel homogenizáltunk, majd 3,5 μl merkaptóetanollal lizáltuk a sejteket. A lizátumot centrifugálva szűrtük át az 1. szűrőn (1', 11.000g), majd 350 μl 70%-os etanol adtuk hozzá és ismét centrifugálva a 2. szűrőn is átszűrtük (30 sec, 11.000 g), ekkor kötöttük meg a szűrőn a nukleinsavakat. A szilika membránt kimosztuk 350 μl membrán desalting buffer (MDB) segítségével. A kapott oldathoz 10 μl rDNÁzt, 90 μl rDNáz reakció puffert és 95 μl rDNáz reakció mixet pipettáztunk, majd szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk, így a dezoxiribonukleáz enzim a működését segítő puffer és a mix segítségével megemésztette a mintában lévő DNS-t. Ezt követően a membránt centrifugálás közben 200 μl RA2 (30 sec, 11.000 g), majd 600 μl RA3 (30 sec, 11.000 g), végül ismét 250 μl RA3 pufferrel (2', 11.000 g) lemostuk és kiszárítottuk. A totál sejt RNS-t tartalmazó oldatot 60 μl ribonukleáz mentes vízzel oldottuk le a membránról (1', 11.000 g). Végül 0,5 μl ribonukleáz gátlót

adtunk hozzá és az oldatot felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

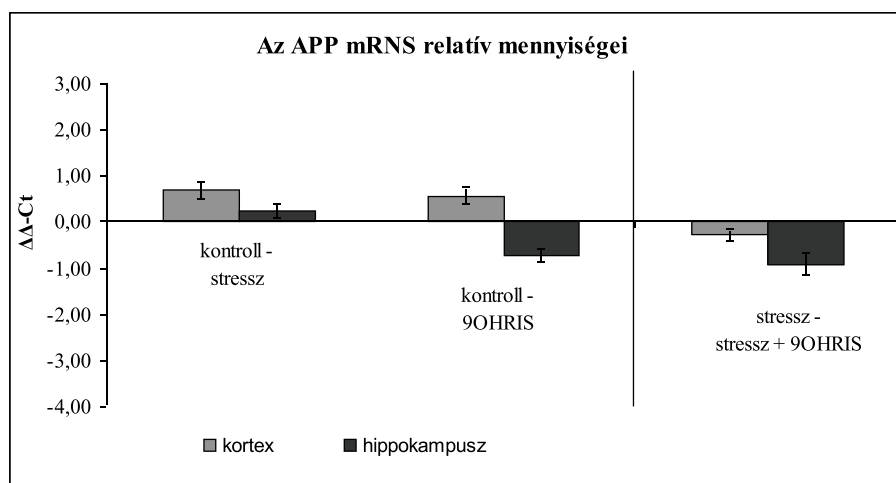
Real time polimeráz láncreakció (RT-PCR)

Az oldatok totál RNS koncentrációját spektrofotometriás módszerrel Nanodrop készülékkel mértük meg. A 2 $\mu\text{g}/15\text{ }\mu\text{l}$ koncentrációra hígított RNS oldatokhoz adtuk hozzá a 15 μl reverz transzkripció kocktél (reverz transzkriptáz (1,5 μl), DNS polimeráz, monomerek (1,2 μl), random primer (3 μl), RT puffer (3 μl), ribonukleáz inhibitor és bideszillált víz (4,8 μl)). A PCR-gépben a reverz transzkriptáz a totál sejt mRNS-ről copy DNS-t (cDNS) szintetizált, majd 9 μl templát cDNS-hez adtuk 10 μl Roche SYBR Green Mixet, 1 μl primert. A RT-PCR gép meghatározta az eredeti oldatokban lévő mRNS mennyiségeket.

Statisztika

Az adatok kiértékelése során a $\Delta\Delta C_t$ -módszert alkalmaztuk, a háztartási (referencia) gén a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) volt. A statisztikai kiértékelés során SPSS programot használtunk, one-way anova-t és *post hoc* tesztként Tukey-próbát végeztünk (Livak és Schmittgen, 2002). Az adatokat átlag \pm átlag szórása (standard error of mean: SEM) formában jelentettük meg. Szignifikancia szintnek $p < 0,01$ -t választottunk.

2. ábra. Az APP mRNS relatív mennyiségei



Az első két oszlopban a kontroll állatokhoz viszonyított relatív mRNS mennyiség látható, míg a harmadik oszlopban a krónikus immobilizációs stressz kezelést kapott állatokhoz viszonyított érték van feltüntetve. (9OHRIS – 9-hidroxi-risperidon)

EREDMÉNYEK

A krónikus 21 napos stressz kezelés fokozta a relatív, kontroll állatokhoz viszonyított β -aktin mRNS mennyiséget patkány hippokampuszban (1. ábra). A stressz kezeléssel egyidejűleg 9OHRIS kezelést kapott állatok β -aktin mRNS expresszióját viszonyítva a csak stressz kezelést kapott állatokéhoz (a diagram utolsó két oszlopa), azt találtuk, hogy az egyidejűleg alkalmazott 9OHRIS kezelés a fokozott β -aktin transzkripciót erőteljesen represszálta a hippokampális területeken. A kortikális β -aktin mRNS expresszió nem változott szignifikáns mértékben a stressz kezelés, a 9OHRIS kezelés, vagy ezek együttes alkalmazásának hatására.

Eredményeink szerint sem a stressz kezelés, sem a 9OHRIS kezelés, sem ezek együttes alkalmazása nem befolyásolta a relatív APP és MAPK1 mRNS szinteket a kortikális vagy hippokampális területeken patkány agyban (2. és 3. ábra).

MEGBESZÉLÉS

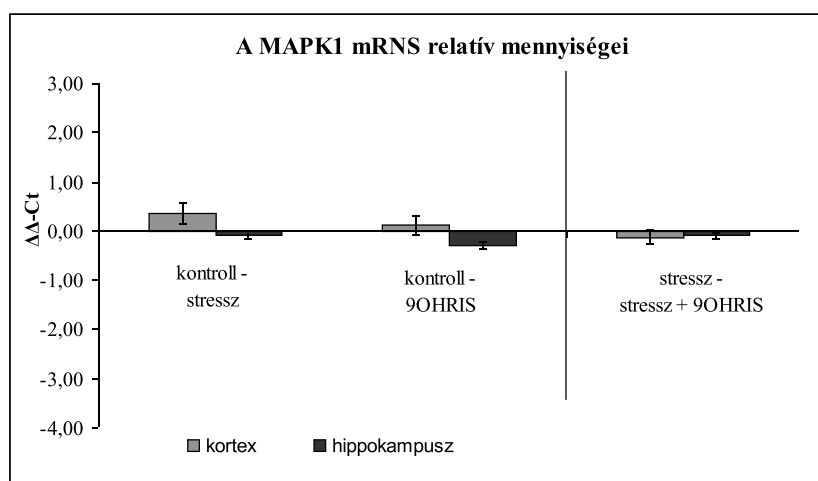
A 9OHRIS, a risperidon aktív metabolitja, az anyavegyülethez, a risperidonhoz hasonlóan atípusos antipszichotikum, mely többek között a D_2 receptor család (D_{2Sh} , D_{2Lh} , D_3 , D_4) és a $5HT_{2A}$ receptor kompetitív antagonistájaként fejti ki hatását (Leysen és mtsai, 1994). A 9OHRIS jelenleg Magyarországon csak szkizofréniában indikált, de az alampolekula

a hazai és külföldi szakmai protokollok szerint alkalmazható a demenciák BPSD tüneteinek kezelésére is. Stressz kezeléssel együtt alkalmazva hatásairól eddig még nem található adat az irodalomban. Eredményeink szerint a 9OHRIS erőteljesen represszálja a β -aktin stressz választ patkány hippokampuszban.

A β -aktin kulcsszerepet játszik a szinaptikus plaszticitásban, az LTP létrejöttében, így a tanulás folyamatában, azonban kóros körülmények között az intraneuronális térben lerakódó Hirano-testek fő alkotórészeként olyan neurodegeneratív folyamatokban is részt vesz, mint az AK, vagy a Parkinson-kór kialakulása. Az általunk megfigyelt krónikus immobilizációs stressz kezelés hatására fokozódó hippokampális β -aktin mRNS expresszió az irodalomban eddig egyedülálló adat. Hasonló adat csak a corpus pinealeból vett mintákból áll rendelkezésre: Dagnino-Subiabre és mtsai 2006-ban azt találták, hogy a 10 napig alkalmazott immobilizációs stressz kezelést követően a β -aktin mRNS mennyiség nem változott patkány tobozmirigyben.

Fő megfigyelésünk, a β -aktin mRNS megnövekedett expressziója, önmagában azonban még nem ad egyértelmű választ arra, hogy vajon a krónikus stresszre adott válaszreakció részeként egy tanulási-adaptációs folyamatról van szó, vagy a stressz és a megemelkedett glükokortikoid szint által okozott patológiás folyamatok egyik részmechanizmusáról, mely a neuronális plaszticitás sérüléséhez és a dendrittüskék elvesztéséhez vezet. Az irodalomban eddig

3. ábra. A MAPK1 mRNS relatív mennyiségei



Az első két oszlopban a kontroll állatokhoz viszonyított relatív mRNS mennyiség látható, míg a harmadik oszlopban a krónikus immobilizációs stressz kezelést kapott állatokhoz viszonyított érték van feltüntetve. (9OHRIS – 9-hidroxi-risperidon)

közölt adatok szerint a β -aktin overexpresszió szerepét a stressz válaszban az AK BDNF-hipotézise szerint értelmezhetjük: patkányokon végzett krónikus immobilizációs stressz kezelés csökkenti a normál LTP-hez elengedhetetlen BDNF mRNS szintet a kortikális és hippokampális területeken (Park és mtsai, 2009), valamint szignifikánsan csökkenti a hippokampális neuronok dendrit tüskéinek számát (Magarinos és McEwen, 1995).

Több mint száz tanulmány bizonyította, hogy ahogy depresszióban, szkizofréniában is a stressz reakció létrejöttéért felelős hipotalamusz – hipofízis – mellékvesekéreg tengely diszfunkciója figyelhető meg (Tandon és Halbreich, 2003). Ismert, hogy a KIR-ben előforduló dopaminerg neuronok nagy számban expresszálnak CRH receptorokat (Sauvage és Steckler, 2001), amely választ adhat ezen idegsejtek fokozott stressz-modulálhatóságára. Kísérletek szerint a D_2 receptor család antagonista 9OHRIS a synapsin 1 gén transzkripciójának szabályozásán keresztül módosíthatja a BDNF modulált glutamát felszabadulást, melynek központi szerepe van az LTP létrejöttében (Corena-McLeod és mtsai, 2008). Így elképzelhető, hogy a 9OHRIS neuroprotektív szerepet tölt be az általunk megfigyelt stressz indukálta β -aktin overexpresszió csökkentése és a szinaptikus plaszticitás védelme révén. Megfigyeléseinket támasztják alá azon kutatások is, melyek szerint más atípusos antipszichotikumok szintén neuro- és szinaptoprotektív szereppel rendelkezhetnek, azáltal, hogy

emelik a dendrittüskékben jelenlévő, az NMDA-receptorokat és az aktin filamentumokat stabilizáló spinophilin expresszióját a hippokampális neuronokban (Critchlow és mtsai, 2006).

Kísérleteinkben sem a stressz, sem a 9OHRIS kezelés hatására nem találtunk változást a GAPDH mRNS szintekben, így háztartási génnek tekintettük mintáink kiértékelése során. Corena-McLeod és mtsai által 2008-ban végzett 28 napos vizsgálatok szerint az intraperitoneális 9OHRIS kezelés fokozza a GAPDH transzlációt az idegsejtekben. A látszólag ellentmondó eredményekre választ adhatnak a módszertani eltérések: az említett szerzők kisebb 1 mg/testsúly kg-os dózisban, intraperitoneálisan adagolták a hatóanyagot 4 héten keresztül. Ezzel szemben mi tápszondán keresztül adtuk a 4mg/testsúly kg-os dózist és csak 3 héten át. További metodikai különbség, hogy Corena-McLeod és mtsai a minták kiértékelése során *ex vivo* szinaptoneurosomális preparátumokkal dolgoztak, ami szintén magyarázhatja az eltérő eredményeket.

A stressz és az AK lehetséges kapcsolatai közül eddig több kutatás irányult az A β -hipotézis vizsgálatára. Ezek legtöbbször transzgenikus egér modellt használtak fel, és a vizsgálatok szerint a stresszhormonok emelik az A β mennyiséget az extracelluláris térben (Green és mtsai, 2006). Azt azonban, hogy ezt a hatást az APP expresszió emelése révén, vagy az APP poszttranszlációs módosításában résztvevő enzimek modulálása révén teszik, még nem sikerült tisztázni. Patkányokon végzett kísérleteink arra utalnak,

hogyan a stressz nem az APP expresszió emelése révén vehet részt az AK pathomechanizmusában.

Az AK tau-hipotézise és a stressz kapcsolatának felderítésére irányuló vizsgálatok szerint a 14 napos immobilizációs stressz kezelés fokozza a tau foszforilációt és csökkenti a szintén mikrotubulus stabilizáló szereppel rendelkező mikrotubulus-asszociált protein 2 (MAP) fehérje expresszióját patkány kortexben és hippocampusban (Yan és mtsai, 2010). Transzgenikus egerekben a stressz hormonok jelenléte emeli a tau-transzkripciót (Green és mtsai, 2006). Eredményeink azt támasztják alá, hogy a stressz valószínűleg nem a tau foszforilációban is szerepet játszó MAPK1 transzkripció fokozása révén vezet tau-hiperfoszforilációhoz patkányban. A tau-hipotézis és a patológiás foszforilációban résztvevő kináz-foszfataz jel utak komplexitása miatt ez a kérdés további vizsgálatokat igényel, figyelembe véve, hogy a CRH receptorok kalcium-independens mechanizmusa részben a MAPK szignálon keresztül valósul meg (Kovalovsky és mtsai, 2002).

Összefoglalva, kísérleteink szerint a krónikus stressz kezelés fokozza a β -aktin transzkripciót patkány hippocampusban. Eredményeink a krónikus stressz hatására bekövetkező hippocampális citoskeletális folyamatok jelentőségére hívják fel a figyelmet. A hippocampusz többek között a tanulás, a stressz válasz valamint a félelmi, védekezési reakciók regulálásában vesz részt, kóros körülmények között (hosszantartó stressz, depresszió) területén patológiás morfológiai és funkcionális eltérések figyelhetők meg. Eredményeink ezen, eddig még pontosan nem ismert mechanizmusok megértéséhez járulhatnak hozzá, és rámutatnak, hogy az atípusos antipszichotikum 9OHRIS szerepet tölthet be a stressz indukálta β -aktin overexpresszió modulálásában.

Köszönetnyilvánítás: Munkánk a Dél-Alföldi Neurobiológiai Tudásközpont és a SROP-4.2.2.-08/1-2008-0002, az OTKA (60589) és a ETT (052-07/2/2009) pályázatok támogatásával készült.

Levelező szerző: Kálmán Sára, SZTE, DNT, 6725 Szeged, Szikra u. 2. tel.: 06-70-252-9479
e-mail: kalmansara@gmail.com

IRODALOM

- Behan DP, Grigoriadis DE, Lovenberg T, Chalmers D, Heinrichs S, Liaw C, De Souza EB: Neurobiology of corticotropin releasing factor (CRF) receptors and CRF-binding protein: implications for the treatment of CNS disorders. *Mol Psychiatry*. 1996; 1(4):265-77.
- Corena-McLeod M del P, Oliveros A, Charlesworth C, Madden B, Liang YQ, Boules M, Shaw A, Williams K, Richelson E: Paliperidone as a mood stabilizer: a pre-frontal cortex synaptoneurosomal proteomics comparison with lithium and valproic acid after chronic treatment reveals similarities in protein expression. *Brain Res*. 2008; 1233:8-19.
- Critchlow HM, Maycox PR, Skepper JN, Krylova O: Clozapine and haloperidol differentially regulate dendritic spine formation and synaptogenesis in rat hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2006; 32(4):356-65.
- Dagnino-Subiabre A, Zepeda-Carreño R, Díaz-Véliz G, Mora S, Aboitiz F: Chronic stress induces upregulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and integrin α 5 expression in the rat pineal gland. *Brain Res*. 2006; 1086(1):27-34.
- De Strooper B, Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active gamma-secretase complex. *Neuron*. 2003; 38(1):9-12.
- Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F, Ohta Y, Mizuno K, Inokuchi K: Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron*. 2003; 38(3):447-60.
- Green KN, Billings LM, Roozendaal B, McGaugh JL, LaFerla FM: Glucocorticoids increase amyloid-beta and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2006; 26(35):9047-56.
- Heuser I, Lammers CH: Stress and the brain. *Neurobiol Aging*. 2003; 24 Suppl 1:S69-76; discussion S81-2.
- Hirano A: Hirano bodies and related neuronal inclusions. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1994; 20(1):3-11.
- Kline AE, Massucci JL, Zafonte RD, Dixon CE, DeFeo JR, Rogers EH: Differential effects of single versus multiple administrations of haloperidol and risperidone on functional outcome after experimental brain trauma. *Crit Care Med*. 2007; 35(3):919-24.
- Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E: Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by RH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol*. 2002; 16(7):1638-51.
- Leysen JE, Janssen PM, Megens AA, Schotte A: Risperidone: a novel antipsychotic with balanced serotonin-dopamine antagonism, receptor occupancy profile, and pharmacologic activity. *J Clin Psychiatry*. 1994; 55 Suppl:5-12.
- Livak K.J., Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402-408, 2001.
- Magariños AM, McEwen BS: Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience*. 1995; 69(1):89-98.
- Pákási M, Kálmán J: Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2008; 53(5):103-11.
- Park SW, Lee CH, Lee JG, Lee SJ, Kim NR, Choi SM, Kim YH: Differential effects of ziprasidone and haloperidol on immobilization stress-induced mRNA BDNF expression in the hippocampus and neocortex of rats. *J Psychiatr Res*. 2009; 43(3):274-81.
- Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH: Plasma corticosterone levels during repeated resensitization of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiol Behav*. 1988; 43(1):47-55.
- Rex CS, Lin CY, Kramár EA, Chen LY, Gall CM, Lynch G: Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term

- potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J Neurosci*. 2007; 27(11):3017-29.
19. Sauvage M, Steckler T: Detection of corticotropin-releasing hormone receptor 1 immunoreactivity in cholinergic, dopaminergic and noradrenergic neurons of the murine basal forebrain and brainstem nuclei--potential implication for arousal and attention. *Neuroscience*. 2001; 104(3):643-52.
 20. Sekino Y, Kojima N, Shirao T: Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochem Int*. 2007; 51(2-4):92-104.
 21. Shahani N, Brandt R: Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2002; 59(10):1668-80.
 22. Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM: Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci*. 1995; 15(3 Pt 1):1768-77.
 23. Tandon R, Halbreich U. The second-generation 'atypical' antipsychotics: similar improved efficacy but different neuroendocrine side effects. *Psychoneuroendocrinology*. 2003; 28 Suppl 1:1-7.
 24. Wilson RS, Barnes LL, Mendes de Leon CF, Aggarwal NT, Schneider JS, Bach J, Pilat J, Beckett LA, Arnold SE, Evans DA, Bennett DA. Depressive symptoms, cognitive decline, and risk of AD in older persons. *Neurology*. 2002; 59(3):364-70.
 25. Yan J, Sun XB, Wang HQ, Zhao H, Zhao XY, Xu YX, Guo JC, Zhu CQ. Chronic restraint stress alters the expression and distribution of phosphorylated tau and MAP2 in cortex and hippocampus of rat brain. *Brain Res*. 2010; 1347:132-41.
 26. Zetterberg H, Blennow K, Hanse E: Amyloid beta and APP as biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2010; 45(1):23-9.
 27. Zhu X, Rottkamp CA, Boux H, Takeda A, Perry G, Smith MA: Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000; 59(10):880-8.

9-hydroxy-risperidone (9OHRIS) prevents stress-induced β -actin overexpression in rat hippocampus

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent form of neurodegenerative dementias. The aetiology and the exact pathomechanism of AD is not known, but stress has been considered recently in the aetiology. Beside the abnormal metabolism of the amyloid – precursor protein (APP), the hyperactivity of the mitogen – activated protein kinase 1 (MAPK1) involved in the hyperphosphorylation of the tau proteins – which are considered as the major component of neurofibrillary tangles –, in addition to β -actin, being involved in synaptogenesis and neuronal plasticity, are all considered as important contributors of the development of AD specific neuropathological changes. The major aim of our present investigation was to examine the effect of stress on the expression of APP, MAPK1 and β -actin mRNAs in the rat hippocampus and cortex. The effect of 9-hydroxy-risperidone (9OHRIS) on the transcription of these genes was also examined. Adult, male Wistar rats were exposed to chronic immobilization stress for 3 weeks. The 9OHRIS (4 mg/bwkg) was administered by gastric tube. Four groups were formed depending on the treatment: (1) control, (2) stress, (3) 9OHRIS, (4) stress and parallel 9OHRIS treatment (n=5-6). The expression of APP, MAPK1, β -actin mRNAs from the perfused brain samples was measured with real-time PCR technique. The β -actin mRNA was significantly overexpressed in the hippocampus after 3 weeks of stress treatment. On the other hand, the stress induced hippocampal β -actin mRNA overexpression was repressed by the 9OHRIS treatment. There were no changes in the cortical or hippocampal expression of APP and MAPK1 mRNAs after neither the stress nor the 9OHRIS treatments. These results emphasize the importance of the stress induced β -actin expression in rat hippocampus. The stress induced alterations in the β -actin RNA expression could be associated with neuronal plasticity and adaptional processes, which could be modified by the 9OHRIS treatment. Our findings indicate that a second generation antipsychotic drug could have a beneficial effect in the pathomechanism of stress and this may have relevance in the treatment of such devastating conditions like AD and psychotic disorders.

Keywords: Alzheimer's disease, stress, hippocampus, amyloid-precursor protein, mitogen-activated protein kinase, β -actin, 9-hydroxy-risperidone, real-time PCR