

**Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej  
im. Ludwika Hirszfelda  
Polskiej Akademii Nauk**



*Rozprawa doktorska*

**mgr inż. Wioletta Kazana-Płuszka**

**Badania nad mechanizmem działania kompleksu peptydowego yolkina  
jako potencjalnego nutraceutyku w prewencji i leczeniu zaburzeń  
towarzyszących procesom starzenia**

*Promotor dr hab. Agnieszka Zabłocka*

*Pracę wykonano w Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu  
Zakład Mikrobiologii, IITD PAN*

Wrocław 2023

*Pragnę serdecznie podziękować:*

***Dr hab. Agnieszce Zabłockiej*** za opiekę merytoryczną, przekazaną wiedzę i cenne wskazówki, poświęcony czas i naukę pierwszych kroków w ścieżce naukowej

***Józefie Macale*** za wszelką pomoc w laboratorium i dobre towarzystwo

***Zespołowi dawnego Laboratorium Białek Sygnałowych oraz Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu*** za pomoc, przekazaną wiedzę i wsparcie oraz życzliwą atmosferę

***Współpracownikom z Grupy Badawczej Bioinżynierii (Łukasiewicz-PORT)*** za serdeczną atmosferę i motywację w trudniejszych chwilach

***Wszystkim Koleżankom i Kolegom,*** którzy przyczynili się do powstania tej pracy

***Rodzinie oraz Przyjaciółom*** za okazane wsparcie i zrozumienie w tym okresie

*Pracę dedykuję mojemu kochanemu mężowi-doktorantowi, z którym razem wspieraliśmy się w okresie doktoranckich zmagani, a teraz razem wkraczamy na ścieżkę rodzicielstwa*

## SPIS TREŚCI

<b>1. Wykaz skrótów .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Streszczenie.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Summary.....</b>	<b>12</b>
<b>4. Wstęp .....</b>	<b>14</b>
4.1. Starzenie się jako naturalny i nieodwracalny proces biologiczny .....	14
4.2. Ośrodkowy układ nerwowy (OUN) .....	14
4.2.1. Budowa i funkcje ośrodkowego układu nerwowego.....	14
4.2.2. Zmiany zachodzące w starzejącym się mózgu.....	15
4.2.3. Rola stresu oksydacyjnego w procesie starzenia mózgu.....	16
4.2.4. Peptydy amyloidu beta jako czynnik patologiczny w mózgu .....	18
4.2.5. Neurogeneza wieku dorosłego.....	19
4.2.6. Neurotrofiny i ich rola w OUN .....	20
4.3. Czynniki neurotroficzne pochodzenia mózgowego - BDNF.....	21
4.3.1. Ekspresja.....	21
4.3.2. Synteza i uwalnianie.....	21
4.3.3. Funkcje BDNF związane z aktywacją specyficznych receptorów.....	23
4.3.4. Strategie uzupełniania niedoborów białka BDNF w zaburzeniach związanych z OUN.....	25
4.4. Czynniki transkrypcyjne aktywowane w odpowiedzi na cAMP – CREB .....	26
4.5. Szlaki sygnałowe aktywujące czynniki CREB .....	28
4.5.1. cAMP-PKA .....	28
4.5.2. Szlaki sygnałowe zależne od wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia .....	30
4.5.3. Szlak PI3K/AKT .....	32
4.5.4. Szlak związany z kinazami MAP.....	34
4.6. Nutraceutyki.....	36
4.7. Kompleks peptydowy wyizolowany z żółtka jaja kurzego – yolkina .....	37
4.7.1. Właściwości immunoregulatorowe yolkiny .....	39
4.7.2. Właściwości pro-kognitywne yolkiny .....	40
<b>5. Cel pracy.....</b>	<b>42</b>
<b>6. Materiały i metody.....</b>	<b>43</b>
6.1. Odczynniki chemiczne i reagenty .....	43
6.2. Zestawy gotowe .....	45
6.3. Przeciwciała.....	46
6.4. Sekwencje oligonukleotydów .....	47
6.5. Aparatura i akcesoria .....	47
6.6. Linie komórkowe.....	48

6.7. Programy komputerowe.....	48
6.8. Izolacja i oczyszczanie kompleksu peptydowego yolkina z żółtek jaj kurzych.....	48
6.9. Ocena czystości i stabilności preparatu yolkina.....	50
6.9.1. Oznaczanie białka metodą BCA.....	50
6.9.2. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) .....	50
6.9.3. Oznaczanie czystości mikrobiologicznej preparatu yolkina .....	51
6.10. Ocena stabilności przechowalniczej yolkiny .....	51
6.11. Ocena stabilności termicznej yolkiny.....	51
6.12. Identyfikacja yolkiny metodą spektrometrii mas (MS).....	51
6.12.1. Przygotowanie próbek.....	51
6.12.2. Chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas (LC-MS).....	52
6.13. Hodowle komórkowe.....	52
6.14. Przygotowanie amyloidu beta 1-42 (A $\beta$ 1-42) .....	52
6.14.1. Monomeryzacja A $\beta$ 1-42 .....	52
6.14.2. Agregacja A $\beta$ 1-42.....	53
6.15. Ocena przeżywalności komórek testem MTT .....	53
6.16. Ocena zmian w morfologii komórek techniką mikroskopii świetlnej .....	53
6.17. Analiza poziomu ekspresji genów.....	54
6.17.1. Stymulacja komórek.....	54
6.17.2. Izolacja RNA .....	54
6.17.3. Degradacja genomowego DNA .....	55
6.17.4. Odwrotna transkrypcja na matrycy RNA .....	55
6.17.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR).....	55
6.18. Western Blotting.....	56
6.18.1. Stymulacja komórek PC12 .....	56
6.18.2. Stymulacja komórek H19-7 .....	56
6.18.3. Przygotowanie lizatów komórkowych .....	57
6.18.4. SDS-PAGE.....	57
6.18.5. Elektrotransfer białek.....	57
6.18.6. Immunodetekcja białek.....	57
6.19. Oznaczanie poziomu BDNF testem ELISA.....	58
6.19.1. Stymulacja komórek.....	58
6.19.2. ELISA.....	58
6.20. Pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia .....	59
6.21. Pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu cyklicznego adenozyno-3',5'-monofosforanu (cAMP).....	59
6.21.1. Stymulacja komórek.....	59

6.21.2. ELISA.....	60
6.22. Pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu ROS testem DCFH .....	60
6.23. Pomiar aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH .....	61
6.24. Pomiar aktywności przeciwutleniającej metodą FRAP.....	61
6.25. Pomiar aktywności przeciwutleniającej metodą chelatowania jonów żelaza (II) .....	61
6.26. Pomiar agregacji A $\beta$ 1-42 przy użyciu tioflawiny T (ThT) .....	62
6.27. Ocena stopnia agregacji A $\beta$ 1-42 z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) .....	62
<b>7. Wyniki .....</b>	<b>63</b>
7.1. Charakterystyka kompleksu peptydowego yolkina .....	63
7.1.1. Ocena czystości i stabilności preparatu yolkina .....	63
7.1.2. Identyfikacja yolkiny metodą spektrometrii mas .....	65
7.2. Wybór pierwszego modelu badawczego – linia komórkowa PC12 .....	68
7.2.1. Ocena wpływu yolkiny na przeżywalność komórek PC12 .....	68
7.3. Wpływ yolkiny na produkcję neurotrofiny BDNF przez komórki PC12.....	68
7.3.1. Wpływ yolkiny na wydzielanie dojrzałej formy BDNF (m-BDNF).....	68
7.3.2. Wpływ yolkiny na białkowy produkt ekspresji genu <i>Bdnf</i> .....	70
7.4. Wpływ yolkiny na aktywację czynnika transkrypcyjnego CREB w komórkach PC12 ....	71
7.5. Wpływ yolkiny na aktywację szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za fosforylację czynnika transkrypcyjnego CREB w komórkach PC12 .....	72
7.5.1. Wpływ yolkiny na wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia .....	73
7.5.2. Wpływ yolkiny na wewnątrzkomórkowy poziom cAMP i aktywację kinazy PKA ..	75
7.5.3. Wpływ yolkiny na aktywację szlaku kinaz PI3K/AKT .....	76
7.5.4. Wpływ yolkiny na aktywację kinaz ERK1/2 .....	77
7.6. Wpływ yolkiny na morfologię komórek linii PC12 .....	79
7.7. Wpływ yolkiny na regulację stresu oksydacyjnego.....	80
7.7.1. Wpływ yolkiny na wewnątrzkomórkowy poziom ROS w komórkach PC12 .....	81
7.7.2. Wpływ yolkiny na ekspresję enzymów antyoksydacyjnych w komórkach PC12 ....	82
7.7.3. Pomiar aktywności przeciwutleniającej yolkiny .....	82
7.8. Wpływ yolkiny na toksyczne działanie A $\beta$ 1-42 w komórkach PC12.....	83
7.8.1. Wpływ yolkiny na przeżywalność i morfologię komórek PC12 traktowanych A $\beta$ 1-42.....	83
7.8.2. Wpływ yolkiny na agregację A $\beta$ 1-42.....	84
7.9. Wybór drugiego modelu badawczego – linia komórkowa H19-7 .....	87
7.9.1. Ocena wpływu yolkiny na przeżywalność komórek H19-7 .....	87
7.10. Wpływ yolkiny na wydzielanie m-BDNF przez komórki H19-7 .....	87
7.11. Wpływ yolkiny na aktywację czynnika transkrypcyjnego CREB w komórkach H19-7.....	88
7.12. Wpływ yolkiny na aktywację szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za fosforylację czynnika transkrypcyjnego CREB w komórkach H19-7.....	89

7.12.1. Wpływ yolkiiny na wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia .....	89
7.12.2. Wpływ yolkiiny na wewnątrzkomórkowy poziom cAMP.....	91
7.12.3. Wpływ yolkiiny na aktywację szlaku zależnego od kinaz PI <sub>3</sub> K/AKT.....	91
7.12.4. Wpływ yolkiiny na aktywację kinaz ERK1/2.....	92
7.13. Wpływ yolkiiny na morfologię komórek linii H19-7.....	93
<b>8. Dyskusja.....</b>	<b>96</b>
<b>9. Wnioski.....</b>	<b>109</b>
<b>10. Bibliografia.....</b>	<b>110</b>
<b>11. Dorobek naukowy .....</b>	<b>126</b>

## 1. Wykaz skrótów

<b>Skrót</b>	<b>Rozwinięcie angielskie</b>	<b>Rozwinięcie polskie</b>
<b>AC</b>	<i>adenyl cyclase</i>	cyklaza adenylanowa
<b>AKAPs</b>	<i>PKA-anchoring proteins</i>	białka kotwiczące kinazę białkową A
<b>AKT</b>	<i>protein kinase B</i>	kinaza białkowa B
<b>APP</b>	<i>amyloid precursor protein</i>	białko prekursorowe amyloidu
<b>ATP</b>	<i>adenosine triphosphate</i>	adenozynotrifosforan
<b>A<math>\beta</math></b>	<i>amyloid beta peptides</i>	peptydy amyloidu beta
<b>BDNF</b>	<i>brain derived neurotrophic factor</i>	czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego
<b>bZIP</b>	<i>basic leucine zipper domain</i>	domena zasadowa z zamkiem leucynowym
<b>CaMKs</b>	<i>calcium/calmodulin-regulated protein kinases</i>	kinazy zależne od wapnia/kalmoduliny
<b>cAMP</b>	<i>3',5'-cyclic adenosine monophosphate</i>	cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan
<b>CaRF</b>	<i>calcium-responsive transcription factor</i>	czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na jony wapnia
<b>CAT</b>	<i>catalase</i>	katalaza
<b>CDS</b>	<i>coding DNA sequence</i>	sekwencja kodująca białko
<b>cGMP</b>	<i>guanosine 3',5'-cyclic monophosphate</i>	cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan
<b>CNG channels</b>	<i>cyclic nucleotide-gated channels</i>	kanały jonowe bramkowane cyklicznymi nukleotydami
<b>CPE/NF-<math>\alpha</math>1</b>	<i>carboxypeptidase E</i>	karboksypeptydaza E
<b>CRAC</b>	<i>calcium release-activated channels</i>	kanały jonowe aktywowane uwalnianiem wapnia
<b>CRE</b>	<i>cis-regulatory element</i>	element cis-regulacyjny
<b>CREB</b>	<i>cAMP response element binding protein</i>	czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na cAMP
<b>DG</b>	<i>dentate gyrus</i>	zakręt zębaty hipokampa
<b>EGF</b>	<i>epidermal growth factor</i>	czynnik wzrostu nabłonka
<b>Epac</b>	<i>exchange proteins directly activated by cAMP</i>	czynnik wymiany nukleotydów guaninowych
<b>ER</b>	<i>endoplasmic reticulum</i>	retikulum endoplazmatyczne
<b>ERKs</b>	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>	kinazy regulowane zewnątrzkomórkowo
<b>FGF-2</b>	<i>basic fibroblast growth factor</i>	zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
<b>GDP</b>	<i>guanosine diphosphate</i>	difosforan guanozyny
<b>GPCR</b>	<i>G protein-coupled receptor</i>	receptory sprzężone z białkami G
<b>GPx</b>	<i>glutathione peroxidase</i>	peroksydaza glutationowa
<b>GTP</b>	<i>guanosine-5'-triphosphate</i>	guanozyno-5'-trifosforan
<b>IFN <math>\alpha/\beta</math></b>	<i>alpha/beta interferons</i>	interferon alfa/beta
<b>IGF</b>	<i>insuline-like growth factor</i>	insulinopodobny czynnik wzrostu
<b>IgY</b>	<i>immunoglobulin Y</i>	immunoglobulina Y
<b>IL</b>	<i>interleukin</i>	interleukina
<b>iNOS</b>	<i>inducible nitric oxide synthase</i>	indukowalna syntaza tlenku azotu
<b>IP<sub>3</sub></b>	<i>inositol 1,4,5-trisphosphate</i>	1,4,5-trifosforan inozytolu
<b>JNKs</b>	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>	kinazy białka c-Jun

<b>KID</b>	<i>kinase-inducible domain</i>	domena indukowana kinazą
<b>LDCVs</b>	<i>large dense-core vesicles</i>	duże pęcherzyki o gęstym rdzeniu
<b>LLTP</b>	<i>large lipid transfer protein</i>	duże białka przenoszące lipidy
<b>LTD</b>	<i>long-term depression</i>	długotrwałe osłabienie synaptyczne
<b>LTP</b>	<i>long-term potentiation</i>	długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
<b>L-VGCC</b>	<i>L-type voltage-gated calcium channels</i>	kanały wapniowe bramkowane napięciem
<b>LvH</b>	<i>heavy chain lipovitellin</i>	ciężki łańcuch lipowiteliny
<b>LvL</b>	<i>light chain lipovitellin</i>	lekki łańcuch lipowiteliny
<b>MAP-2</b>	<i>microtubule-associated protein 2</i>	białko towarzyszące mikrotubulom 2
<b>MAPKs</b>	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	kinazy białkowe aktywowane mitogenami
<b>m-BDNF</b>	<i>mature BDNF</i>	dojrzała forma BDNF
<b>MSKs</b>	<i>mitogen and stress activated protein kinases</i>	kinazy białkowe aktywowane mitogenem i stresem
<b>mTOR</b>	<i>mammalian target of rapamycin kinase</i>	ssaczy cel rapamycyny
<b>mTORC2</b>	<i>mammalian target of rapamycin complex 2</i>	białkowy kompleks 2 mTOR
<b>MWM</b>	<i>Morris water maze</i>	labirynt wodny Morrisa
<b>nAChR</b>	<i>nicotinic acetylcholine receptor</i>	receptor nikotynowy acetylocholino
<b>NeuN</b>	<i>neuronal nuclear protein</i>	neuronalne białko jądrowe
<b>NF-κB</b>	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B
<b>NGF</b>	<i>nerve growth factor</i>	czynnik wzrostu nerwów
<b>NMDAR</b>	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>	receptor N-metylo-D-asparaginowy
<b>NO</b>	<i>nitric oxide</i>	tlenek azotu
<b>NOR</b>	<i>novel object recognition</i>	test rozpoznawania nowego obiektu
<b>NRF2</b>	<i>nuclear factor erythrocyte two related factor</i>	czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2
<b>NSCs</b>	<i>neural stem cells</i>	neuronalne komórki macierzyste
<b>NT-3</b>	<i>neurotrophin-3</i>	neurotrofina 3
<b>NT-4</b>	<i>neurotrophin-4</i>	neurotrofina 4
<b>OF</b>	<i>open field</i>	test otwartego pola
<b>OUN/CNS</b>	<i>central nervous system</i>	ośrodkowy układ nerwowy
<b>p75NTR/LNGFR</b>	<i>low-affinity nerve growth factor receptor</i>	receptor niskiego powinowactwa dla czynnika wzrostu nerwów
<b>PDEs</b>	<i>phosphodiesterases</i>	fosfodiesterazy
<b>PDK1</b>	<i>phosphoinositide-dependent kinase-1</i>	kinaza 1 zależna od fosfatydiloinozytolu
<b>PI3Ks</b>	<i>phosphoinositide 3-kinases</i>	kinazy 3-fosfatydiloinozytolu
<b>PIP<sub>2</sub></b>	<i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>	fosfatydiloinozytolo-4,5-bisfosforan
<b>PIP<sub>3</sub></b>	<i>phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>	(3,4,5)-trifosforan fosfatydiloinozytolu
<b>PKA</b>	<i>protein kinase A</i>	kinaza białkowa A
<b>PKC</b>	<i>protein kinase C</i>	kinaza białkowa C
<b>PKI</b>	<i>protein kinase inhibitor</i>	inhibitor kinazy białkowej
<b>PLC</b>	<i>phospholipase C</i>	fosfolipaza C
<b>PPi</b>	<i>pyrophosphate</i>	pirofosforan



<b>pre-pro-BDNF/ pro-BDNF PRP</b>	<i>precursor BDNF</i> <i>proline-rich polypeptide complex</i>	prekursor BDNF kompleks polipeptydowy bogaty w prolinę foswityna
<b>Pv</b>	<i>phosvitin</i>	foswityna
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>	reaktywne formy tlenu
<b>RSKs</b>	<i>ribosomal s6 kinases</i>	kinazy rybosomalne s6
<b>RTK</b>	<i>receptor tyrosine kinase</i>	receptor kinazy tyrozynowej
<b>sAC</b>	<i>soluble adenyl cyclase</i>	rozpuszczalna cyklaza adenylanowa
<b>SOD</b>	<i>superoxide dismutase</i>	dysmutaza ponadtlenkowa
<b>SS</b>	<i>signal sequence</i>	peptyd sygnałowy
<b>SVZ</b>	<i>subventricular zone</i>	warstwa podkomorowa komory bocznej
<b>TGFβ</b>	<i>transforming growth factor beta</i>	transformujący czynnik wzrostu beta
<b>TNFRs</b>	<i>tumor necrosis factor receptors</i>	receptory czynnika martwicy nowotworu
<b>Trks</b>	<i>tropomyosin-related kinase</i>	receptor kinazy związanej z tropomiozyną
<b>TRP</b>	<i>transient receptor potential</i>	kanały jonowe z rodziny receptorów przejściowego potencjału
<b>USF-1/2</b>	<i>upstream stimulatory factor-1/2</i>	czynnik stymulujący-1/2
<b>UTR</b>	<i>untranslated region</i>	region niepodlegający translacji
<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i>	czynnik wzrostu śródbłonna naczyń
<b>Vtgs</b>	<i>vitellogenins</i>	witellogeniny
<b>Vwfd</b>	<i>von Willebrand factor type D domain</i>	domena D czynnika von Willebranda
<b>YGP40</b>	<i>yolk glycoprotein of 40 kDa</i>	40 kDa glikoproteina żółtka

## 2. Streszczenie

Według najnowszych badań udział populacji starzejącej się (wiek powyżej 65 r.ż.) w polskim społeczeństwie wynosi 18,8%. Sytuacja ta wytwarza potrzebę łagodzenia negatywnych konsekwencji naturalnego i nieodwracalnego procesu, dotyczącego populację, jakim jest starzenie się. Ograniczenie wpływu chorób i niepełnosprawności przy jednoczesnym zachowaniu wysokich funkcji poznawczych, umysłowych i fizycznych pozwala na pomyślniejsze przeżycie tego okresu. W aspekcie zachowania dobrej kondycji psychicznej i fizycznej istotnym organem jest mózg, który wraz z wiekiem zmniejsza swoją objętość, co ma związek nie tylko z obumieraniem komórek nerwowych, ale również z ich degeneracją, zmniejszeniem liczby rozgałęzień oraz kolców dendrytycznych. Ponieważ starzejące się społeczeństwo stanowi duży (wciąż rosnący) odsetek całej populacji, co raz częściej sięga się po naturalne sposoby wsparcia naszego organizmu. Jednym z działań prozdrowotnych jest stosowanie nutraceutyków, które są naturalnymi substancjami biologicznie aktywnymi, pozyskiwanymi m.in. z roślin, owoców morza, produktów pszczelich, siary lub jaj. Nutraceutyki mogą korzystnie wpłynąć na organizm poprzez modyfikowanie procesów fizjologicznych lub metabolicznych, a ich stosowanie wpływa pozytywnie na opóźnianie procesów starzenia się organizmu. Jednym z bardzo dobrych źródeł do pozyskania nutraceutyków są ptasie jaja, które zawierają wiele cennych substancji, niezbędnych do wzrostu i ochrony rozwijającego się zarodka. Dekadę temu odkryto, że IgY wyizolowanej z żółtka jaja kurzego towarzyszy aktywna immunologicznie frakcja polipeptydowa o masie cząsteczkowej 1-35 kDa, którą nazwano yolkiną. Analiza sekwencji aminokwasowej N-końcowego fragmentu yolkiny wykazała homologię do C-końcowego fragmentu witellogeniny II. W ciągu ostatniej dekady, odkąd odkryto w żółtku kurzych jaj kompleks peptydowy yolkina, udało się wykazać wiele jego właściwości, głównie immunoregulatorowych, mających korzystny wpływ na organizm.

Doniesienia literaturowe wskazują, że białka o właściwościach immunoregulatorowych mogą również odgrywać istotną rolę w ochronie i regulacji funkcji centralnego układu nerwowego. W badaniach na myszach z eksperymentalnym modelem choroby Alzheimera wykazano, że myszy otrzymujące preparat yolkiny doustnie uzyskały lepsze wyniki testów behawioralnych, oceniających ich zdolność do zapamiętywania i uczenia się. Kolejne badania sprawdzające wpływ yolkiny na funkcje poznawcze starzejących się szczurów wykazały, że yolkina zwiększa ich aktywność lokomotoryczną oraz znacząco poprawia ich pamięć przestrzenną i epizodyczną. Przeprowadzone dotychczas badania wykazały korzystny wpływ yolkiny na poprawę funkcji pamięciowych i poznawczych u zwierząt. Stąd, ważnym celem kolejnych badań stało się wyjaśnienie molekularnego mechanizmu działania yolkiny w regulacji funkcji centralnego układu nerwowego. Wiele badań wskazuje na to, iż neuroprotektoryjne oraz pro-kognitywne właściwości substancji wspierających układ nerwowy wiążą się z aktywacją szlaków prowadzących do zwiększonej ekspresji i wydzielania neurotrofin. Jednym z istotnych czynników neurotroficznych, pełniącym istotną rolę w rozwoju i funkcjonowaniu centralnego układu nerwowego, w tym w procesach uczenia się i tworzenia pamięci, jest neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF).

Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie molekularnego mechanizmu działania kompleksu peptydowego yolkina w kontekście wydzielania białka BDNF oraz aktywacji szlaków sygnałowych, prowadzących do aktywacji czynnika CREB, będącego głównym regulatorem ekspresji *Bdnf*. Kolejnym celem było również zbadanie aktywności przeciwutleniającej yolkiny, jej zdolności do regulacji aktywności systemu antyoksydacyjnego oraz jej wpływu na agregację A $\beta$ 1-42. W badaniach wykorzystano komórki szczurzego guza chromochłonnego nadnerczy PC12-Tet-On, które mają neuroektodermalne pochodzenie oraz zdolność do fenotypowego różnicowania się w kierunku komórek podobnych do neuronów współczulnych w odpowiedzi na czynnik wzrostu

nerwów (NGF). W celu potwierdzenia specyficznych właściwości yolkiny uzyskanych dla komórek neuropodobnych PC12 wykorzystano linię komórkową H19-7, którą stanowią unieśmiertelnione komórki prekursorowe hipokampa szczura.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pozwoliły na dokładną charakterystykę kompleksu peptydowego yolkina, który po raz pierwszy został wyizolowany i scharakteryzowany dekadę temu. Udało się wykazać, że kompleks peptydowy yolkina stymuluje komórki neuropodobne linii PC12 oraz unieśmiertelnione komórki hipokampa H19-7 do aktywacji ścieżek sygnałowych zależnych od aktywności PI3K/AKT oraz cAMP-PKA, które zaangażowane są w procesy proprzeżyciowe i ochronne, poprzez aktywację czynnika CREB oraz zwiększoną ekspresję *Bdnf*. Dodatkowo wykazano, że yolkina mimo, iż nie posiada własnej aktywności przeciwutleniającej aktywuje system obrony antyoksydacyjnej i chroni komórki przed szkodliwym działaniem wolnych rodników tlenowych oraz toksycznym działaniem agregatów białka A $\beta$ 1-42. Wykazane ochronne i prokognitywne działanie yolkiny sprawia, że kompleks ten wydaje się być potencjalnym kandydatem na nutraceutyk, z możliwością zastosowania w prewencji i wspomaganiu leczenia zaburzeń towarzyszących procesom starzenia.

### 3. Summary

According to the latest research, the share of the aging population (age over 65) in Polish society is 18.8%. This situation creates the need to mitigate the negative consequences of the natural and irreversible process affecting the population, which is aging. Reducing the impact of diseases and disabilities while maintaining high cognitive, mental and physical functions ease the day-to-day activities of elderly people. The brain is an organ responsible for the preservation of mental and physical wellbeing but it decreases in size with aging. Brain shrinkage is related not only to the death of nerve cells, but also to their degeneration, reduction in the number of branches and dendritic spines. Because the aging population is a major challenge in modern societies, natural ways to support the human body are attracting more and more attention. One of the pro-health activities is the use of nutraceuticals, which are natural biologically active substances, obtained, among others, from plants, seafood, beekeeping products, colostrum or eggs. Nutraceuticals can have a beneficial effect on the body by modifying physiological or metabolic processes, and their use has a positive effect on delaying the body's aging processes. One of the very good sources of nutraceuticals are bird eggs, which contain many valuable substances necessary for the growth and protection of the developing embryo. A decade ago, it was discovered that IgY isolated from hen egg yolk is accompanied by an immunologically active peptide fraction with a molecular weight of 1-35 kDa, which was called yolkin. Analysis of the amino acid sequence of the *N*-terminal fragment of yolkin showed homology to the *C*-terminal fragment of vitellogenin II. Since the discovery of the yolkin peptide complex in hen egg yolk many of its properties, mainly immunoregulatory, have been studied, potentially having a beneficial effect on the body.

Literature reports indicate that proteins with immunoregulatory properties may also play an important role in the protection and regulation of functions of the central nervous system. Studies with mice with an experimental model of Alzheimer's disease showed that oral administration of yolkin in mice performed better on behavioral tests designed for assessment of their learning abilities and memory formation. Subsequent studies examining the effect of yolkin on the cognitive functions of aging rats have shown that yolkin increases their locomotor activity and significantly improves their spatial and episodic memory. The studies conducted so far have shown the beneficial effect of yolkin on the improvement of memory and cognitive functions in animals. Hence, an important goal of subsequent research was to explain the molecular mechanism of the action of yolkin on the nervous system. Many studies indicate that the neuroprotective and pro-cognitive properties of substances supporting the nervous system are associated with the activation of pathways that increase neurotrophins' expression and secretion. One of the important neurotrophic factors that plays an important role in the development and functioning of the central nervous system, including the processes of learning and memory formation, is the brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

The main objective of this study was to investigate the molecular mechanism of impact of the yolkin peptide preparation in the context of BDNF protein secretion and activation of signaling pathways leading to the activation of the CREB factor, which is the main regulator of *Bdnf* expression. Another aim was to investigate the antioxidant activity of yolkin, its ability to regulate the activity of the antioxidant system and its effect on A $\beta$ 1-42 aggregation. The study used PC12-Tet-On rat adrenal pheochromocytoma cells, which have a neuroectodermal origin. PC12 cells are also reported to differentiate phenotypically into sympathetic neuron-like cells in response to nerve growth factor (NGF). In order to confirm the specific properties of yolkin obtained with PC12 neuron-like cells, the cell line H19-7, which is immortalized rat hippocampal precursor cells, was also used.

The results presented in this dissertation enabled a thorough characterization of the yolkin peptide complex, which was isolated and characterized for the first time a decade ago. It has been

shown that the yolkin peptide complex stimulates PC12 neuron-like cells and immortalized H19-7 hippocampal cells to activate signaling pathways dependent on the activity of PI3K/AKT and cAMP-PKA, which are involved in pro-survival and protective processes, through the activation of the CREB factor and increased *Bdnf* expression. What is more, despite the fact that yolkin does not have its own antioxidant activity, it is able to activate the antioxidant defense system and to protect cells against the harmful effects of free oxygen radicals and the toxic impact of A $\beta$ <sub>1-42</sub> protein aggregates. The proven protective and pro-cognitive effect of yolkin creates an opportunity for the substance to be a potential candidate for a nutraceutical that may be successfully used in the prevention and treatment of disorders related to the aging processes.

## **4. Wstęp**

### **4.1. Starzenie się jako naturalny i nieodwracalny proces biologiczny**

Starzenie się jest naturalnym, nieodwracalnym procesem biologicznym, któremu towarzyszy stopniowe pogarszanie się struktury i funkcji ciała. Średnia długość życia rośnie, dlatego zwiększa się populacja osób starszych i pojawia się potrzeba polepszenia jakości życia tzw. udanego starzenia się (ang. *successful ageing*) czyli zdrowego, produktywnego i dobrego procesu starzenia się. Meta-analiza czynników związanych z udanym starzeniem się wykazała kilka istotnych cech: brak chorób i niepełnosprawności, wysokie funkcje poznawcze, umysłowe i fizyczne, aktywne zaangażowanie w życie oraz dobre przystosowanie psychiczne w późniejszym życiu [1]. Można zatem mówić o dwóch rodzajach starzenia się: starzenie normalne, zdrowe, gdy widoczne jest niewielkie pogorszenie funkcji poznawczych, naturalnie występujących ze względu na upływ czasu oraz starzenie patologiczne, któremu towarzyszy znaczne pogorszenie stanu zdrowia, otępienie oraz inne schorzenia. Pamięć robocza (krótkotrwała), a także szybkość przetwarzania informacji stopniowo słabną przez całe dorosłe życie. Jednak normalną utratę pamięci związaną z wiekiem od patologicznej utraty pamięci odróżnia zarówno stopień upośledzenia, jak i tempo pogorszenia funkcji poznawczych [2]. Na zmiany molekularne i komórkowe, które pojawiają się podczas normalnego procesu starzenia mają wpływ dodatkowo oddziaływania z genami oraz środowisko. To właśnie przebieg tych oddziaływań decyduje o tym, czy komórki zestarzeją się w sposób naturalny, czy ulegną degeneracji [3]. Z obserwacji wynika, że starzenie się ciała jest poprzedzone procesami zachodzącymi w mózgu, dlatego prawidłowe funkcjonowanie tego organu jest prekursorem dobrej kondycji ogólnej starzejącego się organizmu.

### **4.2. Ośrodkowy układ nerwowy (OUN)**

#### **4.2.1. Budowa i funkcje ośrodkowego układu nerwowego**

Składający się z mózgowia oraz rdzenia kręgowego ośrodkowy układ nerwowy (OUN/CNS, ang. central nervous system), poprzez analizę docierających bodźców oraz kontrolę reakcji, jest głównym koordynatorem pracy narządów wewnętrznych organizmu. Ponadto sprawuje on kontrolę nad czynnościami poznawczymi, takimi jak koncentracja, zapamiętywanie czy uczenie się [4]. OUN zbudowany jest z dwóch podstawowych tkanek: istoty szarej oraz istoty białej. Istota szara składa się głównie z ciał komórek nerwowych, komórek glejowych i naczyń włosowatych. Obejmuje obszary mózgu zaangażowane w kontrolę pracy mięśni, pamięć oraz emocje. Istota szara występuje w mózgu, pniu mózgu, mózdzku oraz w rdzeniu kręgowym. Rozmieszczona jest głównie na powierzchni półkul mózgu i mózdzku, tworząc korę mózgu i korę mózdzku. Natomiast w rdzeniu kręgowym znajduje się po jego wewnętrznej stronie, w przeciwieństwie do istoty białej znajdującej się na zewnątrz. W mózgu istota biała znajduje się pod korą zbudowaną z istoty szarej. Składa się głównie z wypustek neuronów, w tym aksonów otoczonych osłonką mielinową i otaczających je komórek glejowych. Substancja biała odpowiada za przesyłanie informacji w obrębie OUN, odgrywa również ważną rolę w procesie uczenia się i zapamiętywania [5], [6].

Mózg składa się średnio z około 86 miliardów neuronów i prawie takiej samej liczby komórek glejowych, które tworzą gęstą sieć komunikacyjną [7]. Podstawową jednostką sieci neuronowej jest neuron, który zbudowany jest z ciała komórki oraz dwóch rodzajów wypustek nerwowych: dendrytów oraz aksonów. Neurony tworzące sieci neuronowe są ze sobą połączone poprzez synapsy (elektryczne lub chemiczne), za pomocą których aksony i dendryty z różnych neuronów komunikują się wzajemnie [8]. W mózgu dominują synapsy chemiczne, gdzie informacje przekazywane są poprzez uwolnienie neuroprzekaźnika z jednego neuronu

i przechwycenie go przez sąsiednią komórkę. Natomiast w synapsach elektrycznych cytoplazma sąsiadujących komórek jest połączona poprzez kanały międzykomórkowe zwane połączeniami szczelinowymi, które umożliwiają dwukierunkowy przepływ jonów. Dzięki neuroprzekaźnikom możliwa jest zamiana sygnału elektrycznego na chemiczny i przekazanie sygnału do kolejnej komórki [9]. Szacuje się, że istnieje ponad 100 neuroprzekaźników obejmujących aminokwasy, monoaminy, neuropeptydy, puryny oraz gazoprzekaźniki. W zależności od rodzaju wydzielanego neuroprzekaźnika neurony można podzielić na neurony dopaminergiczne (uwalniające dopaminę), noradrenargiczne (uwalniające noradrenalinę), cholinergiczne (uwalniające acetylocholinę), serotoninericzne (uwalniające serotoninę) oraz GABA-ergiczne (uwalniające GABA) [10].

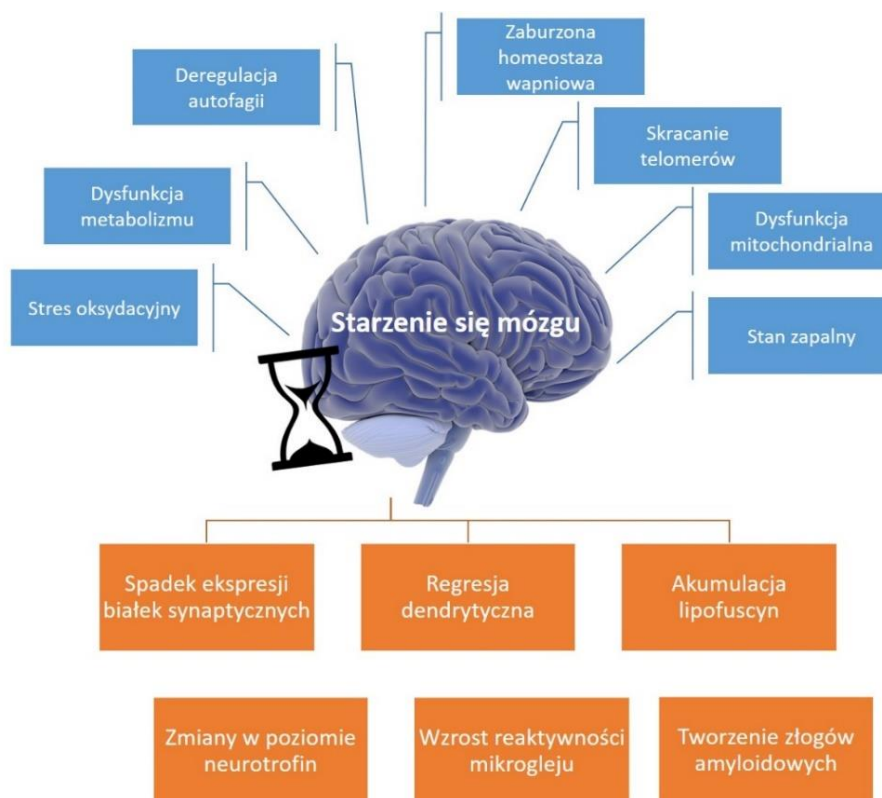
Drugą populacją komórek budujących OUN są komórki głejowe. Obecnie wiadomo, że nie pełnią jedynie funkcji substancji scalającej, otaczającej komórki nerwowe, ale są też istotne dla rozwoju i funkcjonowania układu nerwowego. Komórki głejowe można podzielić na cztery główne typy: mikroglej, astrocyty, oligodendrocyty i polidendrocyty (komórki głejowe NG2) [11]. Komórki te zaangażowane są między innymi w tworzenie bariery krew-mózg, fagocytozę, przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, utrzymanie homeostazy jonowej, synaptogenezę oraz tworzenie osłonki mielinowej aksonów [12].

#### **4.2.2. Zmiany zachodzące w starzejącym się mózgu**

Mózg rozwija się intensywnie głównie przez pierwsze dwie dekady życia człowieka. Około 20 roku życia osiąga maksymalną masę, która u kobiet wynosi 1250-1300g, a u mężczyzn 1400g [13]. Zmiany związane ze starzeniem się mózgu widoczne są już na poziomie makroskopowym przez zmniejszenie objętości tkanki mózgu, a zwiększenie objętości komór. Ujawnia się atrofia istoty szarej, natomiast w mniejszym stopniu istoty białej. Po 35 roku życia mózgowie człowieka traci co roku ok. 0,2% swojej masy. Natomiast po 60 roku życia widać znaczny wzrost tempa utraty masy mózgowia o około 0,5% na rok [14], [15]. Obecnie wiadomo, że zmiany te nie są związane jedynie z obumieraniem komórek nerwowych, mimo iż spadek liczby neuronów jest zauważalny. Dodatkowo proces zmniejszenia masy mózgowia ma charakter zróżnicowany i nie jest jednakowy dla wszystkich struktur OUN [16]. Jednym z najbardziej podatnych obszarów na te zmiany jest kora przedczołowa, która zaangażowana jest w powstawanie pamięci roboczej, emocje, planowanie oraz funkcje wykonawcze. Neurony w tym obszarze posiadają mniejszą liczbę rozgałęzień oraz kolców dendrytycznych [17], [18]. Kolejnym obszarem wrażliwym na procesy starzenia jest hipokamp, który również z wiekiem ulega zmniejszeniu. Jego główne role to utrwalanie informacji z pamięci krótkotrwałej do pamięci długotrwałej i zależne od kontekstu uczenie się przestrzenne, a także regulacja zachowań emocjonalnych [19], [20].

Ilość czynników wpływających na proces starzenia jest duża i zmienna, obejmuje ona między innymi: stres oksydacyjny, zaburzenia metabolizmu komórkowego, zaburzenie procesu autofagii, skracanie telomerów, dysfunkcję mitochondrialną, zaburzenie komórkowej homeostazy wapniowej i ogólnoustrojowej modulacji stanu zapalnego [21], [22]. Zmiany widoczne w procesie starzenia się mózgu obejmują spadek ekspresji białek synaptycznych [23], regresję dendrytyczną w neuronach piramidalnych [24], akumulację pigmentów fluorescencyjnych (lipofuscyn) [25], tworzenie się złogów amyloidowych [26], zmiany w poziomie ekspresji i wydzielania czynników neurotroficznych [27] oraz wzrost reaktywności mikrogleju [28]. W trakcie normalnego procesu starzenia w mózgu dochodzi do sukcesywnego zwiększania ilości modyfikowanych zasad DNA, białek oraz lipidów. Gdy dojdzie do zwiększonej akumulacji tych uszkodzonych makrocząsteczek, których usuwanie jest zaburzone, normalny proces

starzenia się przekształca się w proces neurodegeneracyjny [29]. Czynniki powodujące starzenie się oraz wynikające z tego zmiany w mózgu przedstawiono na Rysunku 4.1.



**Rysunek 4.1. Czynniki zaangażowane w proces starzenia oraz wynikające z tego zmiany w mózgu.**

W proces starzenia zaangażowane są stres oksydacyjny, zaburzenia metabolizmu komórkowego, zaburzenia procesu autofagii, skracanie telomerów, dysfunkcja mitochondrialna, zaburzenie komórkowej homeostazy wapniowej oraz ogólnoustrojowej modulacji stanu zapalnego. Skutkiem tego są zmiany w mózgu dotyczące spadku ekspresji białek synaptycznych, regresji dendrytycznej w neuronach piramidalnych, akumulacji lipofuscyn, tworzenia się złożeń amyloidowych, zmiany w poziomie ekspresji i wydzielania czynników neurotroficznych oraz wzrostu reaktywności mikrogleju.

#### 4.2.3. Rola stresu oksydacyjnego w procesie starzenia mózgu

Tlen ( $O_2$ ) jest kluczową cząsteczką dla organizmów tlenowych i służy jako końcowy akceptor elektronów w procesie pozyskiwania energii metabolicznej na drodze szeregu reakcji redoks zachodzących w komórkach. Formy pośrednie powstające w procesie redukcji  $O_2$  nazywane są reaktywnymi formami tlenu (ROS, ang. reactive oxygen species). ROS można podzielić na dwie grupy, pierwszą stanowią cząsteczki nierodnikowe, do których zaliczamy nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), wodorotlenki organiczne (ROOH), tlen singletowy ( $^1O_2$ ), wzbudzony karbonyl (RCO), ozon ( $O_3$ ), a także kwas podchlorawy (HOCl) oraz podbromowy (HOBr). Druga grupa obejmuje wolne rodniki (z co najmniej jednym wolnym elektronem). Zaliczamy do nich anion ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ), rodnik hydroksylowy ( $OH^{\bullet}$ ), rodnik nadtlenkowy ( $ROO^{\bullet}$ ) oraz rodnik alkoksylowy ( $RO^{\bullet}$ ) [30]. ROS są jednymi z najważniejszych czynników biorących udział w regulacji procesów fizjologicznych w komórkach eukariotycznych. Pełnią one między innymi rolę mediatorów w procesach wzrostu, dojrzewania i apoptozy komórek, regulują poziom energii w komórkach, modulują ekspresję genów, kontrolują przebieg reakcji zapalnej oraz procesy



sygnalizacji komórkowej [31]. ROS są również ważnymi neuroprzekaznikami wtórnymi, istotnymi dla wielu procesów neurologicznych m.in. plastyczności synaptycznej [32].

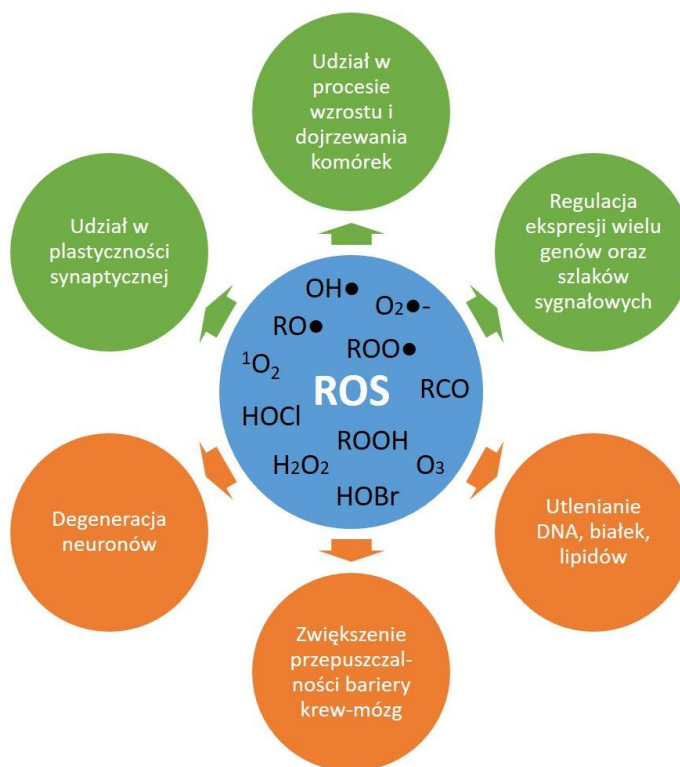
W sytuacji, gdy proces generowania reaktywnych form tlenu w komórce istotnie przekracza zdolność ich neutralizacji dochodzi do przesunięcia równowagi w kierunku reakcji utleniania i rozwoju stresu oksydacyjnego [33]. Prowadzi to do poważnych zaburzeń sprawnie działających mechanizmów naprawczych, co może prowadzić do utleniania komponentów komórkowych takich jak lipidy, białka czy DNA, upośledzając prawidłowe funkcjonowanie komórki. Stres oksydacyjny jest zatem jednym z elementarnych przyczyn rozwoju wielu chorób (w tym neurodegeneracyjnych) oraz odgrywa ważną rolę w przyspieszeniu procesów starzenia [34].

Działanie ROS w organizmie równoważone jest przez przeciwutleniacze, których główną rolą jest hamowanie utleniania oraz przekształcenie ROS w ich nieaktywne pochodne. Do tego celu komórki wykorzystują dwa systemy antyoksydacyjne: enzymatyczny i nieenzymatyczny. System nieenzymatyczny skupia przeciwutleniacze niskocząsteczkowe, które stanowią zabezpieczenie komórek przed reakcjami wolnorodnikowymi. Są to substancje ochronne, które przekazują wolnym rodnikom swoje elektrony, dzięki czemu tracą one zdolność utleniania innych składników. Zalicza się do nich między innymi: witaminy (A, C, E, K), minerały (cynk, selen), kofaktory (koenzym Q10), peptydy (glutation) oraz polifenole (flawonoidy, kwas fenolowy) [35]. Natomiast do grupy antyoksydantów enzymatycznych zalicza się dysmutazę ponadtlenkową (SOD, ang. superoxide dismutase; EC 1.15.1.1), peroksydazę glutationową (GPx, ang. glutathione peroxidase; EC 1.11.1.9) oraz katalazę (CAT, catalase; 1.11.1.6) [31]. Enzymy te są specyficzne dla danego regionu komórki. Pierwszą linię obrony w repertuarze enzymów antyoksydacyjnych stanowi dysmutaza ponadtlenkowa. U człowieka, zidentyfikowano trzy izoformy SOD: cytozolową (Cu/ZnSOD, SOD1), mitochondrialną (MnSOD, SOD2) oraz zewnątrzkomórkową (EcSOD, SOD3), które katalizują dysmutację  $O_2^-$  do  $O_2$  i  $H_2O_2$  [36]. Podstawowym mechanizmem usuwania  $H_2O_2$  i nadtlenków lipidów w cytozolu i mitochondrium jest reakcja katalizowana przez GPx, która wykorzystuje glutation do redukcji  $H_2O_2$  i wodoronadtlenków [37]. Natomiast CAT zlokalizowana jest głównie w peroksysomach i odpowiedzialna jest za rozkład  $H_2O_2$  do cząsteczek  $H_2O$  i  $O_2$  [38].

W 1956 roku Denham Harman opisał potencjalny związek między produkcją wolnych rodników tlenowych i ich szkodliwym wpływem na organizm, wskazując starzenie jako proces spowodowany przez wolne rodniki [39]. Wraz z wiekiem, w wyniku działania wolnych rodników wzrasta liczba uszkodzonych makrocząsteczek, które wpływają na pogorszenie funkcjonowania organizmu. Zatem rola stresu oksydacyjnego w procesie starzenia wydaje się bardzo istotna. Mózg jest bardzo wrażliwym organem na stres oksydacyjny ze względu na intensywny metabolizm tlenowy, dużą zawartość lipidów, wysokie zapotrzebowanie na energię, słabą aktywność antyoksydacyjną, obecność metali aktywnych w reakcjach redoks (miedź i żelazo) oraz wysoki poziom utleniających wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [40]. Mechanizmy, za pośrednictwem których ROS powodują uszkodzenia tkanki mózgowej, prowadzą do zwiększenia przepuszczalności bariery krew-mózg oraz do zmian morfologii mózgu. Uszkodzenia te powodują indukcję reakcji zapalnej, co prowadzi w ostateczności do śmierci neuronów. Szczególnie wrażliwe na uszkodzenia są neurony hipokampa oraz komórki ziarniste w mózdzku [41], [42]. ROS uszkadzają również kanały wapniowe, a także osłonki mielinowe aksonów, co prowadzi do degeneracji neuronów [43]. Wpływ reaktywnych form tlenu na ośrodkowy układ nerwowy przedstawiono na Rysunku 4.2.

Oslabienie aktywności systemów antyoksydacyjnych stoi za wzrostem wskaźnika uszkodzeń oksydacyjnych obserwowanym wraz z wiekiem, i jest jednym z głównych katalizatorów procesów starzenia. Stąd, możliwość usprawnienia działania systemów naprawczych

i antyoksydacyjnych organizmu np. poprzez odpowiednią dietę, suplementację czy aktywność fizyczną, wydaje się kluczowa dla utrzymania lepszej kondycji psychicznej oraz fizycznej [43].



**Rysunek 4.2. Funkcje reaktywnych form tlenu w ośrodkowym układzie nerwowym.** W środkowej części schematu (pole w kolorze niebieskim) wymieniono przykłady rodnikowych i nierodnikowych reaktywnych form tlenu. Pola w kolorze zielonym zawierają opis pozytywnego wpływu ROS na działanie OUN, natomiast ich negatywny wpływ opisany został w polach pomarańczowych.

#### 4.2.4. Peptydy amyloidu beta jako czynnik patologiczny w mózgu

Peptydy amyloidu beta ( $A\beta$ , ang. amyloid beta peptides) zawierają od 39-43 aminokwasów i powstają z białka prekursorowego amyloidu (APP, ang. amyloid precursor protein) [44]. APP jest integralnym białkiem membranowym ulegającym ekspresji w wielu typach komórek, natomiast jego największa ekspresja została potwierdzona w synapsach neuronalnych. APP składa się z pojedynczej domeny transbłonowej, dużego zewnątrzkomórkowego *N*-końca i krótszego cytoplazmatycznego *C*-końca. W komórce, APP produkowany jest w kilku izoformach o wielkości od 695 do 770 aminokwasów. Izoforma APP695 produkowana jest głównie przez neurony w mózgu [45]. W procesowaniu APP do  $A\beta$  biorą udział  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekreazy, które powodują uwalnianie peptydów amyloidu beta do przestrzeni pozakomórkowej. Droga degradacji APP z udziałem  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekreazy, zachodząca w endosomach, nazywana jest drogą amyloidogenną i prowadzi do powstawania 40- i 42- aminokwasowych fragmentów posiadających największą zdolność do agregacji i charakteryzujących się wysoką toksycznością [46], [47]. Przetwarzanie białka APP z udziałem  $\alpha$ - i  $\gamma$ -sekreazy zachodzi drogą nieamyloidogenną, w wyniku której powstają peptydy nietoksyczne, nie posiadające zdolności formowania złogów amyloidowych [48].

Uwalniane w warunkach fizjologicznych monomery  $A\beta_{1-42}$  nie wykazują działania toksycznego, a ich niskie stężenie działa korzystnie na regulację procesu plastyczności synaptycznej oraz procesy związane z pamięcią [49]. W warunkach patologicznych produkcja  $A\beta$

wzrasta, a efektywność jego usuwania spada, co prowadzi do jego nadmiernej akumulacji i tworzenia toksycznych i nierozpuszczalnych agregatów A $\beta$ , które gromadzą się w różnych regionach mózgu i stanowią kluczowy czynnik patologiczny prowadzący do degeneracji komórek nerwowych [50]. Podstawy toksycznego działania A $\beta$  dotyczą aktywacji procesów zapalnych poprzez bezpośrednią interakcję z błoną, indukcję stresu oksydacyjnego poprzez tworzenie kompleksu metal-A $\beta$ , zakłócenie funkcjonowania receptorów błonowych, zmianę aktywacji szlaków sygnałowych, tworzenie porów błonowych lub zaburzenie homeostazy jonowej w komórce [51]. Dane literaturowe pokazują, iż proces tworzenia fibryli przebiega poprzez stadium oligomerów, charakteryzujących się znacznie wyższą toksycznością niż formy monomeryczne i fibryle. To właśnie rozpuszczalne oligomery amyloidu beta przyczyniają się w największym stopniu do powstawania zmian patologicznych [50], [51].

#### **4.2.5. Neurogeneza wieku dorosłego**

Neurogeneza to proces tworzenia w pełni funkcjonalnych komórek nerwowych. Przez długi czas uważano, że ośrodkowy układ nerwowy nie ma zdolności regeneracyjnych i pojęcie neurogenezy wieku dorosłego nie istniało. W 1998 roku dzięki pracy Erikssona i jego współpracowników, udało się potwierdzić, że proces ten zachodzi również w mózgu dorosłego człowieka [52]. Dwa najlepiej poznane obszary, w których zachodzi neurogeneza, dzięki obecności neuronalnych komórek macierzystych (NSCs, ang. neural stem cells), to zakręt zębaty hipokampa (DG, ang. dentate gyrus) oraz warstwa podkomorowa komory bocznej (SVZ, ang. subventricular zone), skąd nowe komórki mogą migrować do opuszki węchowej (OB, ang. olfactory bulb) [53]. Przypuszcza się również, że pozostałe obszary, w których mogą powstawać nowe neurony to kora nowa, prążkowie, ciało migdałowate, podwzgórze, istota czarna, pień mózgu, guzek węchowy oraz kora gruszkowata [54]. Wykazano, że nowe zintegrowane neurony mogą aktywnie wpływać na funkcje hipokampa, w tym uczenie się, pamięć oraz sprawność ruchowo-przestrzenną [55]. Neuronalne komórki macierzyste mają zdolność do samoodnowy (symetryczny podział komórek) i różnicowania się w wyspecjalizowane typy komórek OUN takie jak: neurony, astrocyty lub oligodendrocyty [56].

Neurogeneza to złożony i wysoce regulowany proces rozpoczynający się fazą proliferacyjną, gdzie komórki progenitorowe zdolne są do proliferacji oraz multipotencjalnego różnicowania, ale nie są jeszcze zdolne do samoodnowy. Kolejnym etapem jest faza różnicowania, podczas której komórki wychodzą z cyklu komórkowego i są zaangażowane w tworzenie linii neuronalnej. Następnie niedojrzałe neurony wchodzi w fazę migracji, aby dotrzeć do miejsca docelowego, gdzie rozpoczyna się wzrost ich aksonów oraz dendrytów. Ostatni etap to integracja synaptyczna, podczas której nowo powstałe neurony zaczynają tworzyć połączenia z wcześniej istniejącymi połączeniami (synaptogeneza) [56]. Neurony zawierają szereg specyficznych białek, których pojawienie się w komórkach post-mitotycznych wskazuje na ich fenotyp neuronalny. W celu identyfikacji dojrzałych neuronów oznacza się poziom ekspresji markerów białkowych, takich jak neuronalne białko jądrowe (NeuN, ang. neuronal nuclear protein) [57] oraz białko towarzyszące mikrotubulom 2 (MAP-2, ang. microtubule-associated protein 2) [58]. Natomiast białkami pozwalającymi na śledzenie zmian związanych z synaptogenezą są między innymi synapsyny, które zlokalizowane są w błonie presynaptycznej. Synapsyny występują w trzech izoformach: I, II oraz III. W komórkach nerwowych to właśnie synapsyna I związana jest z wydłużeniem aksonów, tworzeniem synaps i regulacją fuzji pęcherzyków synaptycznych [59].

Na proces neurogenezy w dorosłym mózgu ma wpływ wiele czynników egzogennych i endogennych, które determinują proliferację, różnicowanie i przeżycie nowo powstałych komórek. Ich działanie aktywuje lub hamuje poszczególne fazy neurogenezy. Bardzo ważną rolę

w procesie neurogenezy odgrywają czynniki wzrostowe i neurotrofiny. Najważniejsze z nich to czynnik wzrostu nabłonka (EGF, ang. epidermal growth factor), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF/FGF-2, ang. basic fibroblast growth factor), czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor), czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF, ang. brain derived neurotrophic factor), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF, ang. insuline-like growth factor) oraz czynnik wzrostu nerwów (NGF, ang. nerve growth factor) [60]. Oprócz czynników neurotroficznych ważną rolę pełnią również hormony, neuropeptydy oraz białka adhezyjne. Dostępność tych czynników jest związana z mikrośrodowiskiem, w jakim znajdują się NSC, zwanym niszą. Komórki niszy oddziałują na NSC poprzez aktywację lub hamowanie specyficznych genów. W dorosłym mózgu w skład takiej niszy, oprócz NSC, wchodzi komórki wyściółki, komórki śródbłonka naczyń, astrocyty oraz komórki mikrogleju [61], [62].

#### 4.2.6. Neurotrofiny i ich rola w OUN

Neurotrofiny stanowią grupę białek należących do rodziny czynników neurotroficznych. Odgrywają kluczową rolę w regulacji funkcji centralnego i obwodowego układu nerwowego [63]. Neurotrofiny produkowane są przez komórki nerwowe (mózgu, rdzenia kręgowego, obwodowego układu nerwowego) oraz komórki nieneuronalne, takie jak komórki nabłonkowe, fibroblasty, komórki mięśni gładkich czy komórki układu immunologicznego [64]. Do grupy ssaczy neurotrofin należą: BDNF, NGF, neurotrofina 3 (NT-3, ang. neurotrophin-3) oraz neurotrofina 4 (NT 4, ang. neurotrophin-4) [65]. Struktury czwartorzędowe neurotrofin są bardzo podobne, mimo, iż białka te są kodowane przez różne geny. Zbudowane są one z 200-300 reszt aminokwasowych oraz posiadają 50% podobieństwo sekwencji aminokwasowej. Ich wspólną cechą jest również to, iż syntetyzowane są jako białka prekursorowe, które w efekcie procesowania przez proteazy uzyskują aktywność biologiczną. Ponadto, w swojej budowie posiadają trzy mostki dwusiarczkowe budujące węzeł cysteinowy, który sprawia, że są one bardzo stabilne w środowisku zewnątrzkomórkowym [64], [66]. Neurotrofiny występują najczęściej w formie niekowalencyjnie związanych homodimerów, mogą również tworzyć struktury heterodimeryczne [67]. W OUN neurotrofiny biorą udział w kontroli wielu procesów takich jak neurogeneza, dojrzewanie, różnicowanie i przeżywalność komórek nerwowych. Ponadto odgrywają one istotną rolę w regulacji plastyczności synaptycznej, synaptogenezy oraz wzrostu aksonów i dendrytów [63].

Każda z wymienionych wyżej neurotrofin aktywuje jeden lub więcej receptorów kinazy związanej z tropomiozyną (Trks, ang. tropomyosin-related kinase) należących do rodziny receptorów kinazy tyrozynowej (RTK, ang. receptor tyrosine kinase). NGF wiąże się preferencyjnie z receptorem TrkA, BDNF i NT-4 posiadają najwyższe powinowactwo do receptora TrkB, a NT-3 ma najwyższe powinowactwo do receptora TrkC, a niższe do receptorów TrkA i TrkB [65]. Ponadto, w określonych warunkach neurotrofiny są zdolne do wiązania się z receptorem niskiego powinowactwa dla czynnika wzrostu nerwów (p75<sup>NTR</sup>/LNGFR, ang. low-affinity nerve growth factor receptor), który może pełnić zarówno funkcję ko-receptora dla receptora Trk lub indukować niezależny od niego szlak sygnałowy [68]. Związanie neurotrofiny z receptorem z rodziny Trk aktywuje szlaki sygnałowe zaangażowane w neurogenezę, plastyczność synaptyczną czy przeżycie komórek. Natomiast związanie neurotrofiny z receptorem p75<sup>NTR</sup> może prowadzić zarówno do przeżycia, jak i do śmierci komórki, w zależności od obecności jego ko-receptora. Biologiczne właściwości neurotrofin zależą od ich stężenia, formy (prekursor lub forma dojrzała) oraz powinowactwa do receptorów [68], [69].

### 4.3. Czynniki neurotroficzne pochodzenia mózgowego - BDNF

#### 4.3.1. Ekspresja

Czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF, ang. brain-derived neurotrophic factor) jest neurotrofiną, która została wyizolowana po raz pierwszy z mózgu świni w 1982 roku przez Barde i wsp. [70]. Ludzki gen *Bdnf*, zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 11p13-14, odkryto w 1991 roku [71], [72]. Jest on zbudowany z 11 eksonów i obejmuje ok. 70 kpb, ale tylko jeden - ekson IX, zawiera sekwencję kodującą białko (CDS, ang. coding DNA sequence). Pozostałe eksony kodują sekwencje promotorowe, które mogą regulować ekspresję *Bdnf* w różnych typach komórek w odpowiedzi na czynniki aktywujące (Rysunek 4.3) [73]. Każdy ekson na końcu 5' transkryptu *Bdnf* może generować, poprzez alternatywny splicing, specyficzny transkrypt o różnej długości, który charakteryzuje się obecnością wspólnego regionu CDS na końcu 3'. Dodatkowo ilość transkryptów *Bdnf* zwiększa się z uwagi na istnienie dwóch miejsc poliadenylacji w regionie niepodlegającym translacji 3' (3'UTR, ang. 3'untranslated region) eksonu IX. Generuje to dwa rodzaje transkryptów: z regionem krótkim 3'UTR o długości ok. 0,35kb i regionem długim 3'UTR o długości ok. 2,85kb [74]. Badania wykazały, że transkrypt z regionem krótkim 3'UTR pozostaje w ciele komórki, gdzie ulega translacji i pozwala na utrzymanie odpowiedniego stężenia białka BDNF w neuronie spoczynkowym. Translacja tych transkryptów zwiększa fosforylację TrkB, co prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego aktywowanego w odpowiedzi na cAMP (CREB, ang. cAMP response element binding protein) oraz innych białek prowadzących do zwiększonej plastyczności synaptycznej. Natomiast transkrypt z regionem długim 3'UTR jest transportowany do dendrytów, gdzie odgrywa kluczową rolę w procesie dojrzewania kolców dendrytycznych oraz w procesach indukcji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP, ang. long-term potentiation). Wykazano, że w neuronach aktywowanych transkrypt z regionem długim 3'UTR odpowiada za szybką i silną aktywację translacji [75]. W związku z tym, poprzez zastosowanie alternatywnych promotorów i mechanizmów splicingu, można generować różne transkrypty BDNF, z których wszystkie kodują ten sam produkt białkowy.

Analiza ludzkiego genu *Bdnf* ujawniła istnienie dziewięciu sekwencji, które znajdują się pod kontrolą czynników transkrypcyjnych, w tym czynnika transkrypcyjnego aktywowanego w odpowiedzi na jony wapnia (CaRF, ang. calcium-responsive transcription factor), czynnika CREB oraz czynnika stymulującego-1/2 (USF-1/2, ang. upstream stimulatory factor-1/2) [76]. Czynniki te ulegają aktywacji w wyniku napływu jonów wapnia do komórki nerwowej lub poprzez substancje stymulujące, takie jak neurotransmitery, hormony lub czynniki wzrostu, co prowadzi do ekspresji białka BDNF. W kaskadzie aktywacyjnej biorą udział między innymi receptory Trk, receptory sprzężone z białkami G (GPCR, ang. G protein-coupled receptor), kanały wapniowe bramkowane napięciem (L-VGCC, ang. L-type voltage-gated calcium channels) oraz receptor N-metylo-D-asparaginowy (NMDAR, ang. N-methyl-D-aspartate receptor) [76], [77]. Najwyższa ekspresja białka BDNF u ssaków zachodzi w mózgu, zwłaszcza w hipokampie oraz korze mózgowej (część podstawna przodomózgowia), czyli w obszarach odpowiedzialnych za pamięć, uczenie się oraz procesy poznawcze. Oprócz mózgu, ekspresja BDNF zachodzi również w wątrobie, śledzionie, grasicy, przewodzie pokarmowym, płucach, sercu, skórze czy też w tkance mięśniowej gładkiej naczyń krwionośnych [78], [79].

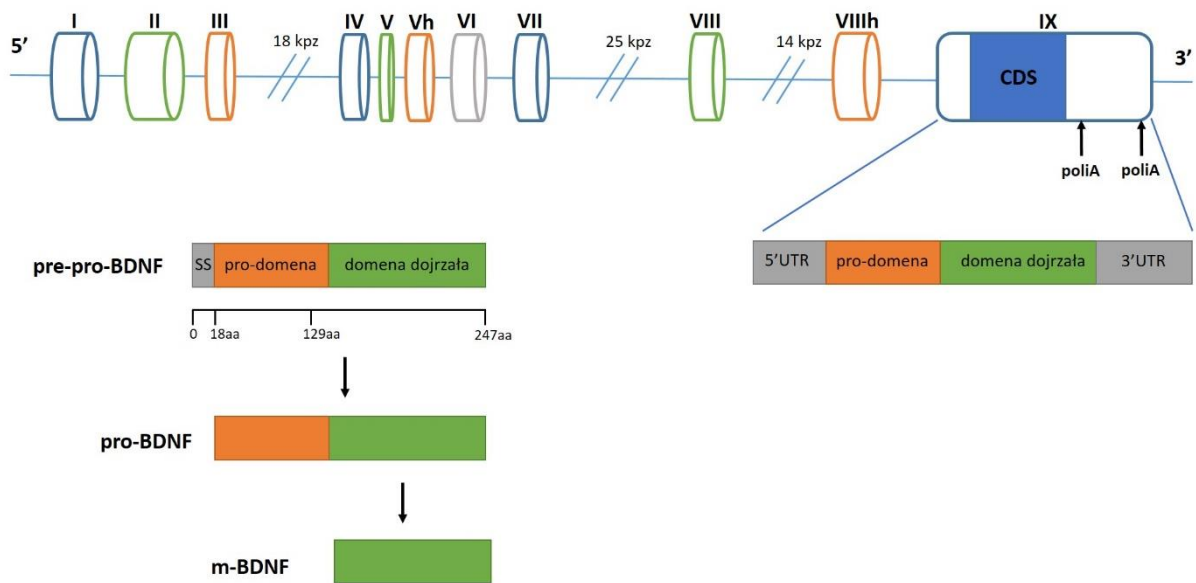
#### 4.3.2. Synteza i uwalnianie

Synteza białka BDNF rozpoczyna się od powstania w retikulum endoplazmatycznym formy pre-pro-BDNF (ang. precursor BDNF), gdzie dochodzi do jej fałdowania oraz przyłączenia reszt cukrowych poprzez wiązanie N-glikozydowe [72], [80]. Z retikulum endoplazmatycznego pre-pro-BDNF transportowany jest do aparatu Golgiego, gdzie wewnątrzkomórkowe proteazy

usuują peptyd sygnałowy (SS, ang. signal sequence) o długości 18 reszt aminokwasowych, dzięki czemu powstaje forma pro-BDNF (ang. precursor BDNF) o masie 28-32 kDa. Forma ta zawiera 111 aminokwasów w *N*-końcowej pro-domenie oraz 118 aminokwasów w *C*-końcowej domenie dojrzałej [80], [81] (Rysunek 4.3). W sieci *trans* aparatu Golgiego pro-BDNF może zostać przekształcony do dojrzałej formy BDNF (m-BDNF, ang. mature BDNF) o masie 14 kDa. Zmiana ta zachodzi poprzez usunięcie pro-domeny przez proteazę (furynę), uwalnianą w komórce w sposób konstytutywny, lub przez konwertazy obecne w pęcherzykach sekrecyjnych [82], [83]. W rezultacie, białko BDNF wydzielane jest przez komórki nerwowe w postaci dojrzałej lub niedojrzałej. W drugim przypadku, metaloproteiny oraz plazmina, zawarte w macierzy międzykomórkowej, mogą przekształcać białko pro-BDNF do formy dojrzałej m-BDNF [84], [85].

Nowo powstały BDNF pakowany jest do pęcherzyków sekrecyjnych, które transportowane są anterogradowo, od ciała komórki nerwowej do jej zakończeń (aksonów lub dendrytów). Pęcherzyki sekrecyjne po oddzieleniu od sieci *trans* aparatu Golgiego kierują się w stronę błony komórkowej, gdzie ulegają fuzji, a ich zawartość uwalniana jest do macierzy zewnątrzkomórkowej. Białko BDNF wydzielane jest przez komórki nerwowe na drodze regulowanej lub konstytutywnej [86]. Ścieżka wydzielania konstytutywnego obejmuje pakowanie białka BDNF do pęcherzyków małej wielkości (50-100 nm), które uwalniają BDNF niezależnie od zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia [Ca<sup>2+</sup>]. Większość białka BDNF wydzielana jest jednak w odpowiedzi na zmiany [Ca<sup>2+</sup>] w komórkach nerwowych, na ścieżce regulowanego wydzielania, w pęcherzykach, które mogą tworzyć tzw. duże pęcherzyki o gęstym rdzeniu (LDCVs, ang. large dense-core vesicles) o średnicy 100-300nm.

Dla regulowanego wydzielania białka BDNF przez komórkę nerwową istotne są dwa białka sortujące – sortilina oraz karboksypeptydaza E (CPE, ang. carboxypeptidase E), które oddziałują z aminokwasami w łańcuchu polipeptydowym BDNF. Sortilina jest receptorem sortującym, który może znajdować się na powierzchni komórki nerwowej lub wewnątrz, gdzie transportuje białka między siecią *trans* aparatu Golgiego, lizosomami, endosomami, a pęcherzykami sekrecyjnymi i błoną komórkową. Wiązanie formy pro-BDNF z sortiliną możliwe jest dzięki interakcji reszt aminokwasowych 44-102, zawartych w prodomenie białka BDNF [87] [88]. CPE zawiera w swoim *C*-końcu amfifilową domenę zbudowaną z 6-aminokwasowego ogona, który umożliwia jej oddziaływanie z membranami sieci *trans* aparatu Golgiego. Lou i wsp. [89] wykazali obecność motywu I<sub>16</sub> E<sub>18</sub> I<sub>105</sub> D<sub>106</sub> w obrębie domeny dojrzałej BDNF, którego prawidłowe rozpoznanie przez CPE jest istotne dla wydzielania BDNF na ścieżce regulowanej. Brak obecności motywu sortującego lub złe fałdowanie domeny dojrzałej powoduje wydzielanie białka BDNF na drodze konstytutywnej [90]. Właściwe sortowanie i wydzielanie białka BDNF ma kluczowe znaczenie dla utrzymania plastyczności synaptycznej, przeżycia neuronów i homeostazy OUN. Nieprawidłowa sekrecja i alokacja białka BDNF w obrębie OUN przyczynia się do występowania chorób o podłożu neurodegeneracyjnym i neuropsychiatrycznym. Zaburzenia w transporcie BDNF mogą występować na skutek zaburzeń w funkcjonowaniu sortiliny oraz CPE, a także na skutek wystąpienia polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w genie kodującym *Bdnf* [87]. Zamiana reszty waliny na resztę metioniny w kodonie 66 (Val66Met) zaburza transport BDNF do dendrytów. Wiąże się to ze zmianami strukturalnymi mózgu (zmniejszenie objętości hipokampa, ciała migdałowatego i kory przedczołowej) oraz ze zmianami w funkcjonowaniu (osłabienie procesów plastyczności synaptycznej, upośledzenie pamięci epizodycznej) [86].

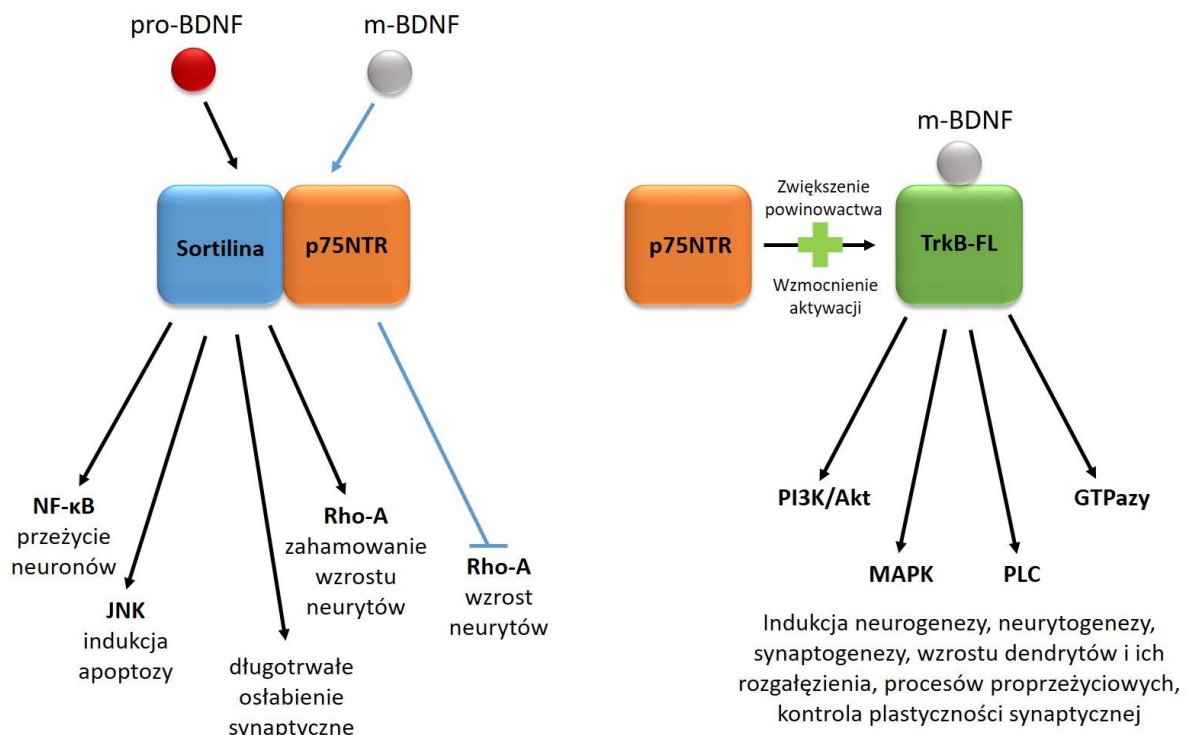


**Rysunek 4.3. Struktura ludzkiego genu *Bdnf* oraz powstających izoform tego białka.** Gen *Bdnf* składa się z 11 eksonów o długości około 70 kbp, z których jedynie ekson IX zawiera sekwencję kodującą białko (CDS). W regionie 3'UTR eksonu IX znajdują się dwa miejsca poliadenylacji (poliA), które pozwalają na tworzenie większej ilości transkryptów. W wyniku translacji powstaje prekursor BDNF (pre-pro-BDNF), który zawiera sekwencję sygnałową (SS) o długości 18 reszt aminokwasowych, pro-domenę (18-129aa) oraz domenę dojrzałą (129-247aa). W wyniku działania proteaz sekwencja sygnałowa zostaje odcięta, powstaje forma pro-BDNF, która dalej może zostać przekształcona do formy dojrzałej m-BDNF. Na podstawie [74], [81].

#### 4.3.3. Funkcje BDNF związane z aktywacją specyficznych receptorów

BDNF został po raz pierwszy opisany jako białko kontrolujące przeżycie neuronów czuciowych, a także wzrost włókien nerwowych [70]. Podobnie jak pozostałe neurotrofiny, zaangażowany jest w różnicowanie, wzrost oraz przeżycie komórek nerwowych ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Spośród innych neurotrofin BDNF wyróżnia udział w procesach związanych z plastycznością synaptyczną (LTP) oraz tworzeniem pamięci długotrwałej [91]. Transport retrogradowy, czyli z zakończeń aksonów do ciała komórki, jest istotny dla przekazywania sygnałów przez czynniki neurotroficzne, które wiążą się z odpowiednimi receptorami. Kontrola dużej liczby procesów w układzie nerwowym, w tym zarówno przeżycia jak i apoptozy, jest możliwa dzięki wiązaniu izoform BDNF do odpowiednich receptorów na powierzchni komórki nerwowej [92]. Forma pro-BDNF może związać się z receptorem p75NTR, należącym do rodziny receptorów czynnika martwicy nowotworu (TNFRs, ang. tumor necrosis factor receptors). Funkcje p75NTR zależą w dużej mierze od jego interakcji z innymi receptorami, ponieważ on sam nie posiada domeny katalitycznej [93]. Powstanie kompleksu pro-BDNF/p75NTR/sortilina może prowadzić do aktywacji kinazy białka c-Jun (JNKs, ang. c-Jun N-terminal kinases), oraz indukcji apoptozy, może też aktywować białko Rho-A, co prowadzi do zatrzymania wzrostu neurytów. Z drugiej strony związanie m-BDNF z p75NTR prowadzi do inaktywacji białka RhoA i uruchomienia procesu neurytogenezy [68], [94], [95]. Kompleks białkowy pro-BDNF/p75NTR/sortilina odpowiada również za aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (NF- $\kappa$ B, ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), co prowadzi do zwiększonego przeżycia neuronów [68]. Ponadto, związanie pro-BDNF z p75NTR w neuronach hipokampalnych jest istotne dla długotrwałego osłabienia synaptycznego (LTD, ang. long-term depression), które jest mechanizmem przeciwnym do LTP i powoduje zmniejszenie skuteczności przekazywania sygnału przez synapsy [96].

Receptorem kluczowym i odpowiedzialnym za większość właściwości m-BDNF wspierających układ nerwowy jest TrkB. Jest to receptor błonowy, zbudowany z kilku domen: domeny kinazy białkowej, domeny transmembranowej, domen immunoglobulino-podobnych oraz zewnątrzkomórkowych domen zawierających dużą ilość reszt cysteinowych oraz leucynowych. Ludzki wariant TrkB posiada cztery izoformy: receptor o pełnej długości (TrkB-FL), receptor posiadający nieaktywną domenę katalityczną (TrkB-T-TK) oraz dwie formy skrócone receptora, nie posiadające domeny kinazy białkowej (TrkB-T1, TrkB-Shc) [92], [97]. Przyłączenie dojrzałej formy BDNF do TrkB-FL inicjuje powstanie dimeru i autofosforylację receptora, co skutkuje aktywacją wielu szlaków sygnałowych, w tym szlaków zależnych od kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPKs, ang. mitogen-activated protein kinases), kinaz 3-fosfatydyloinozytolu (PI3Ks, ang. phosphoinositide 3-kinases), kinazy białkowej B (AKT, ang. protein kinase B), fosfolipazy C (PLC, ang. phospholipase C) oraz GTPazy z rodziny białek Rho. Dzięki aktywacji tych szlaków kompleks m-BDNF/TrkB kontroluje procesy neurogenety [98], neurytogenety [99], synaptogenety [100], procesy antyapoptotyczne i odpowiedzialne za przeżycie [101], plastyczność synaptyczną (LTP) [102] oraz wzrost dendrytów i ich rozgałęzienie [103]. Receptor TrkB-FL może tworzyć heterodimer z receptorem p75NTR, co zwiększa powinowactwo wiązania m-BDNF i wzmacnia aktywację TrkB i dalszych ścieżek sygnałowych [78], [97]. Na Rysunku 4.4 przedstawiono szlaki sygnałowe aktywowane w komórce nerwowej w odpowiedzi na pro-BDNF lub m-BDNF.



**Rysunek 4.4. Szlaki sygnałowe aktywowane w komórce nerwowej w odpowiedzi na pro-BDNF lub m-BDNF.** Pro-BDNF wiążąc się z heterodimerem p75NTR/sortilina aktywuje szlaki zależne od JNK prowadząc do apoptozy komórki, aktywuje białko Rho-A, przez co następuje zahamowanie wzrostu neurytów lub prowadzi do długotrwałego osłabienia synaptycznego. Pro-BDNF/sortilina/p75NTR może również aktywować czynnik NF-κB, który odpowiada za przeżycie neuronów. Natomiast związanie białka m-BDNF z kompleksem p75NTR/sortilina inaktywuje białko RhoA i stymuluje wzrost neurytów. m-BDNF wiążąc się z TrkB-FL aktywuje szlaki zależne od PI3K/Akt, MAPK, PLC lub GTPazy. Aktywacja tych szlaków prowadzi do indukcji procesów neurogenety, neurytogenety, synaptogenety, wzrostu dendrytów i ich rozgałęzienia, promuje przeżycie komórek oraz bierze udział w kontroli plastyczności synaptycznej. Efekt działania i związania się m-BDNF z receptorem TrkB-FL może być wzmocniony przez przyłączenie się do nich receptora p75NTR.



#### 4.3.4. Strategie uzupełniania niedoborów białka BDNF w zaburzeniach związanych z OUN

Starzenie się jest jedną z istotnych przyczyn rozwoju zaburzeń poznawczych. Funkcje poznawcze stopniowo słabną wraz z wiekiem, w wyniku zmian komórkowych i metabolicznych, które prowadzą do redukcji plastyczności synaptycznej w regionach mózgu istotnych dla procesów kognitywnych. Najbardziej wrażliwym regionem jest hipokamp, który odpowiada za tworzenie pamięci długotrwałej oraz orientacji przestrzennej. Badania wykazały zmiany w hipokampalnym LTP u starzejących się zwierząt obejmujące problemy z indukcją oraz trwałością LTP [104]. Jednym z najczęstszych deficytów związanych z plastycznością synaptyczną i procesami starzenia się jest osłabienie sygnalizacji neurotroficznej. Wykazano, że w starzejącym się hipokampie obserwuje się utrudnioną stabilizację LTP, która może zostać przywrócona przez leki stymulujące receptor glutaminianowy AMPA, który indukuje ekspresję BDNF [105]. Udowodniono, że procesom starzenia towarzyszy znaczący spadek ekspresji BDNF w niektórych regionach mózgu, zwłaszcza w hipokampie. Obniżony poziom białka BDNF zaobserwowano w hipokampie starszych szczurów, natomiast wywołanie stanu zapalnego lub infekcji powodowało dodatkowy spadek poziomu tej neurotrofiny [106], [107]. Analiza poziomu BDNF w próbkach ludzkiej surowicy wykazała zredukowany poziom białka wraz ze wzrostem wieku, co wiązało się z wystąpieniem łagodnych zaburzeń poznawczych [108]. Późniejsza analiza ekspresji genów w obszarze kory przedczołowej, w próbkach zebranych *post-mortem* od ludzi, wykazała spadek ekspresji *Bdnf* związany ze wzrostem wieku [109]. Obniżony poziom BDNF może wynikać nie tylko z jego obniżonej transkrypcji, translacji i transportu wewnątrz neuronów, ale również ze spadku ekspresji lub aktywacji jego głównego receptora - TrkB. Ponadto zmianom może towarzyszyć podwyższony poziom pro-BDNF i jego receptora - p75NTR, które razem odpowiedzialne są między innymi za apoptozę komórek nerwowych [110].

BDNF ze względu na swoje znaczenie w rozwoju i funkcjonowaniu OUN zaangażowany jest również w patofizjologię chorób związanych z tym układem. Są to między innymi: choroba Alzheimera [111], choroba Huntingtona [112], choroba Parkinsona [113], depresja [114] oraz schizofrenia [115]. W przypadku wielu z nich obserwuje się obniżony poziom mRNA lub białka BDNF, które często pełni dla tych chorób funkcję biomarkera. Obecnie, jednym z celów terapeutycznych chorób, w których obserwuje się spadek ekspresji BDNF jest przywrócenie właściwego poziomu białka w obszarach mózgu objętych jednostką chorobową [77]. Możliwe jest to poprzez działanie bezpośrednio (iniekcja BDNF, terapia genowa) lub pośrednio, z użyciem substancji lub komórek zwiększających ekspresję *Bdnf* lub aktywujących jego główny receptor - TrkB. W badaniach Schabitz'a i wsp. [116] zastosowano terapię z dożylnym podaniem białka BDNF szczurom, u których wywołano wcześniej miejscowe niedokrwienie mózgu. Dostarczenie białka skutkowało zmniejszeniem obszaru niedokrwienia, spadkiem poziomu białka proapoptotycznego Bax (ang. Bcl-2-like protein 4) oraz wzrostem poziomu białka antyapoptotycznego Bcl-2 (ang. B-cell lymphoma 2), w porównaniu z próbą kontrolną. Zala i wsp. [117] wykazali, że w przypadku szczurzych neuronów pierwotnych ekspresjonujących zmutowaną formę huntingtyny zastosowanie wektorów lentiwirusowych kodujących *Bdnf* ochroniło te komórki przed apoptozą.

Kolejną metodą terapii jest przeszczep komórek, które zdolne są do ekspresji i wydzielania BDNF. Badania z wykorzystaniem mysich mezenchymalnych komórek macierzystych wykazały, że komórki wstrzyknięte do prądkowia myszy, z eksperymentalnym modelem choroby Huntingtona (YAC128), produkowały BDNF, co wpłynęło na zwiększoną przeżywalność neuronów w prądkowiu oraz poprawiło aktywność motoryczną zwierząt [118], [119]. Natomiast zastosowanie cząsteczek, które są agonistami [120], [121], przeciwciałami agonistycznymi

względem TrkB [122], [123] lub peptydomimetykami [124], [125], zdolnymi do aktywacji TrkB, spowodowało aktywację szlaków sygnałowych aktywowanych normalnie przez kompleks m-BDNF/TrkB. Obiecującą strategię stanowią substancje pochodzenia naturalnego, które wykazują właściwości neuroprotektyjne m.in. dzięki pobudzaniu komórek do zwiększonej produkcji BDNF. Szczury z eksperymentalnym modelem depresji po otrzymaniu kurkuminy, polifenolu pochodzącego z Ostryżu długiego (*Curcuma longa*), wykazały zmniejszone skutki chronicznego stresu dzięki przywróceniu aktywacji czynnika CREB oraz zwiększonej ekspresji *Bdnf* [126]. W innych badaniach odnotowano poprawę funkcji odzyskiwania pamięci u szczurów, którym wcześniej wstrzyknięto do kory przedczołowej toksyczne białka amyloidu beta. Poprawa nastąpiła po podaniu rutyny, flawonoidu pochodzącego z Gryki zwyczajnej (*Fagopyrum esculentum*), który zwiększył poziom BDNF i spowodował aktywację szlaku MAPK [127]. Wykorzystanie kwasu rozmarynowego, uzyskiwanego m.in. z Rozmarynu lekarskiego (*Rosmarinus officinalis*), na zwierzęcym modelu z niedokrwieniem mózgu, wywołało efekt neuroprotektyny zapobiegając deficytom pamięci. Związek ten zahamował apoptozę neuronów oraz wpłynął korzystnie na wzrost ekspresji *Bdnf* oraz synaptofizyny [128].

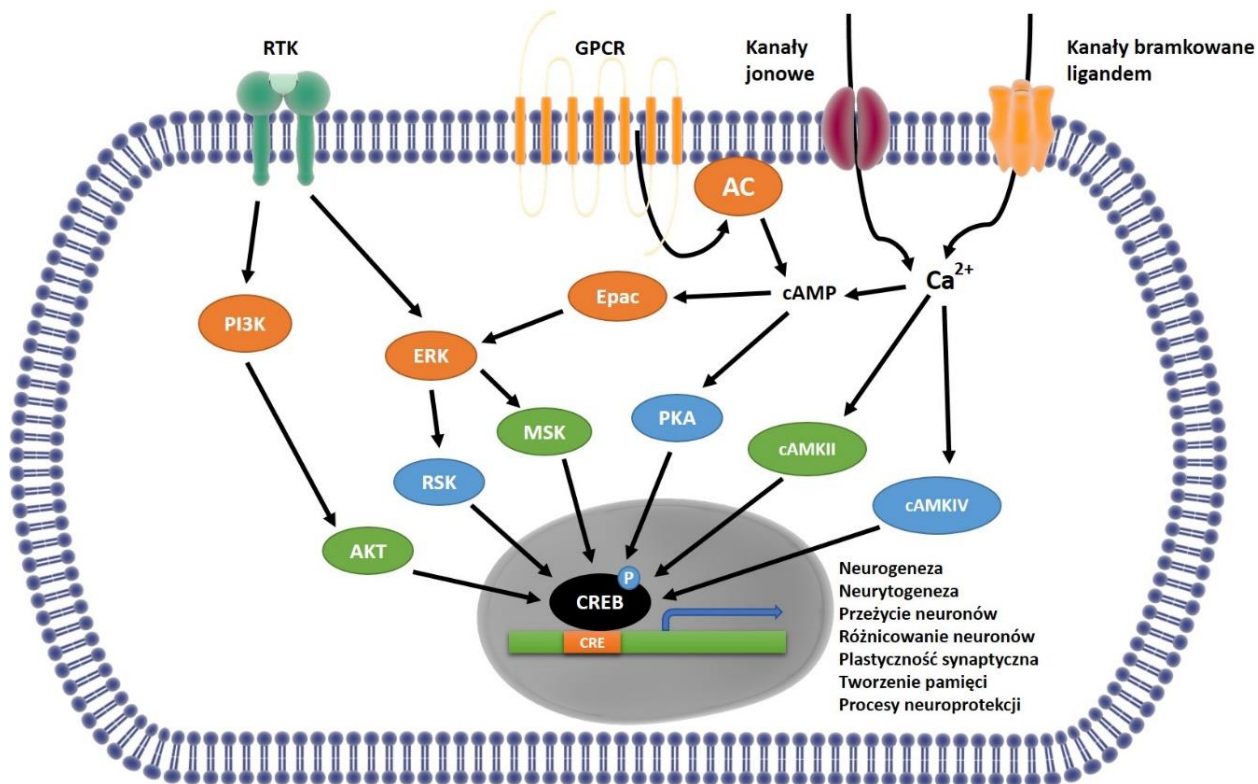
#### **4.4. Czynniki transkrypcyjne aktywowane w odpowiedzi na cAMP – CREB**

Czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na cAMP (CREB, ang. cAMP response element binding protein) należy do nadrodziny czynników transkrypcyjnych zawierających domenę zasadową z zamkiem leucynowym (bZIP, ang. basic leucine zipper domain). CREB jest rozpuszczalnym białkiem o wielkości 43 kDa, zlokalizowanym w jądrze komórkowym, występującym w trzech izoformach:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\Delta$ , których ekspresja jest konstytutywna i zachodzi w większości komórek [129], [130]. W swojej budowie posiada C-końcówkę, zasadową domenę, która bierze udział w wiązaniu DNA oraz domenę zamka leucynowego, warunkującą powstanie hetero- lub homodimerów poprzez połączenie dwóch  $\alpha$ -helis [131]. Oprócz tego posiada domenę indukowaną kinazą (KID, ang. kinase-inducible domain), w obrębie której znajdują się reszty seryny, które mogą być fosforylowane przez kinazy, co prowadzi do aktywacji czynnika CREB. Po dwóch stronach KID znajdują się domeny bogate w reszty glutaminy: domena Q1, która odpowiada za podstawową aktywność transkrypcyjną wiążąc się do kasety TATA oraz domena Q2, która razem z domeną KID odpowiada na czynniki stymulujące, co prowadzi do ekspresji genów zależnych od CREB [132]. Domena Q2 odpowiada również za rozpoznanie i związanie elementu *cis*-regulacyjnego (CRE, ang. *cis*-regulatory element), który zawiera sekwencję palindromową 5'-TGACGTC-3' w genie docelowym. Do nadrodziny CREB należy również białko ATF-1 (ang. activating transcription factor 1) oraz białko CREM (ang. cAMP response element modulator). Czynniki z nadrodziny CREB charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa swojej budowy, zwłaszcza w obrębie domeny bZIP oraz możliwością wiązania do sekwencji CRE [131].

W odpowiedzi na czynniki aktywujące, takie jak neuroprzekaźniki, ligandy lub czynniki wzrostu, w komórce nerwowej uruchamiane są mechanizmy prowadzące do aktywacji kinaz PI3K oraz ERK przez RTKs, wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ) przez kanały jonowe lub bramkowane ligandem oraz wzrostu stężenia cyklicznego adenozyno-3',5'-monofosforanu (cAMP, ang. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate) zależnego od aktywacji GPCR, co prowadzi do aktywacji PKA lub czynnika wymiany nukleotydów guaninowych (Epac, ang. exchange proteins directly activated by cAMP) aktywującego ERK [133]. Aktywacji ulegają szlaki sygnałowe, które pobudzają kinazy bezpośrednio fosforylujące czynnik CREB, takie jak kinazy zależne od wapnia/kalmoduliny (CaMKs, ang. calcium/calmodulin-regulated protein kinases), kinaza białkowa A (PKA, ang. protein kinase A), kinazy białkowe aktywowane mitogenem i stresem (MSKs, ang. mitogen and stress activated protein kinases), kinazy

rybosomalne s6 (RSKs, ang. ribosomal s6 kinases) oraz AKT [129]. Kluczowym etapem aktywacji czynnika CREB jest fosforylacja reszt serynowych, zwłaszcza seryny w pozycji 133 (Ser133) łańcucha polipeptydowego, znajdującej się w domenie KID. Po fosforylacji Ser133, dwie domeny bZIP każdego monomeru CREB łączą się, tworząc aktywny homodimer poprzez motyw zamka leucynowego. Powstały homodimer oddziałuje z koaktywatorami: białkiem wiążącym CREB (CBP, ang. CREB-binding protein), acetylotransferazą histonową p300 (ang. histone acetyltransferase p300) lub koaktywatorami transkrypcji regulowanymi przez cAMP (CRTC, ang. cAMP-regulated transcriptional co-activator,) i wiążą się do miejsca CRE promotora genów docelowych. Koaktywatory te mogą stanowić alternatywne ścieżki indukcji genu docelowego w odpowiedzi na różne bodźce w różnych typach komórek [132], [134]. Klasyczne ścieżki sygnałowe prowadzące do aktywacji czynnika CREB w komórce nerwowej przedstawiono na Rysunku 4.5.

CREB został po raz pierwszy opisany w 1987 roku jako czynnik transkrypcyjny regulujący gen somatostatyny w komórkach szczurzego guza chromochłonnego PC12 [135]. Od tamtej pory wykazano szereg jego funkcji, które stanowią podstawę dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Badania przesiewowe całego genomu [136] pod kątem miejsc wiążących CREB (geny zawierające region CRE) wykazały, że CREB może kontrolować ekspresją ponad 4000 genów, w tym genów kodujących białka zaangażowane w metabolizm (cytochrom c), transkrypcję (ATF-3, c-fos), przeżycie komórek (Bcl-2), cykl komórkowy (cyklina D1, cyklina A) oraz wzrost komórek (BDNF, FGF) [129]. Wyniki badań ostatnich lat uzyskane na ssakach, głównie szczurach i myszach, wykazały kluczowy wpływ białka CREB na prawidłowe funkcjonowanie mózgu. W ośrodkowym układzie nerwowym białko CREB odgrywa kluczową rolę w kontroli procesów takich jak neurogeneza, synaptogeneza [137], przeżywalność neuronów oraz ich różnicowanie [138], kontrola plastyczności synaptycznej i tworzenie pamięci [139], [140]. Najnowsze badania wykazały, że znaczącą rolę dla funkcjonowania CREB ma fosforylacja Ser133, która jest niezbędna dla transmisji synaptycznej, LTP oraz przestrzennej elastyczności poznawczej [141].



**Rysunek 4.5. Szlaki sygnałowe aktywujące czynnik transkrypcyjny CREB.** Neuroprzekaźniki, ligandy, czynniki wzrostu i induktory stresu powodują wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia przez kanały jonowe lub bramkowane ligandem, wzrost cAMP poprzez aktywację receptorów GPC lub aktywację receptorów RTK. Aktywowane szlaki sygnałowe prowadzą do bezpośredniej fosforylacji czynnika CREB przez AKT, RSK, MSK, PKA, CaMKII lub CaMKIV, co aktywuje szereg procesów w komórce. Na podstawie [129], [142].

## 4.5. Szlaki sygnałowe aktywujące czynnik CREB

### 4.5.1. cAMP-PKA

W przekazywaniu sygnału pomiędzy komórkami biorą udział substancje pochodzące z zewnątrz komórki tzw. przekaźniki pierwszego rzędu lub przekaźniki pierwotne (ang. first messengers). Sygnały te są bardzo różnorodne, począwszy od czynników środowiskowych (temperatura, światło), poprzez jony i cząsteczki ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ), metabolity (nukleotydy, aminokwasy), hormony (steroidy), po większe polipeptydy (czynniki wzrostu, chemokiny, kolagen, proteoglikan) [143]. Utworzenie kompleksu receptor-przekaźnik na powierzchni komórki nerwowej uruchamia kaskadę reakcji prowadzących do syntezy i uwalniania tzw. przekaźników wtórnych (ang. second messengers). Należą do nich między innymi jony wapnia, cAMP, cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan (cGMP, ang. guanosine 3',5'-cyclic monophosphate), 1,4,5-trifosforan inozytoli ( $\text{IP}_3$ , ang. inositol 1,4,5-trisphosphate), diacyloglicerol, (3,4,5)-trifosforan fosfatidyloinozytoli ( $\text{PIP}_3$ , ang. phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) oraz tlenek azotu ( $\text{NO}$ , ang. nitric oxide) [144], [145].

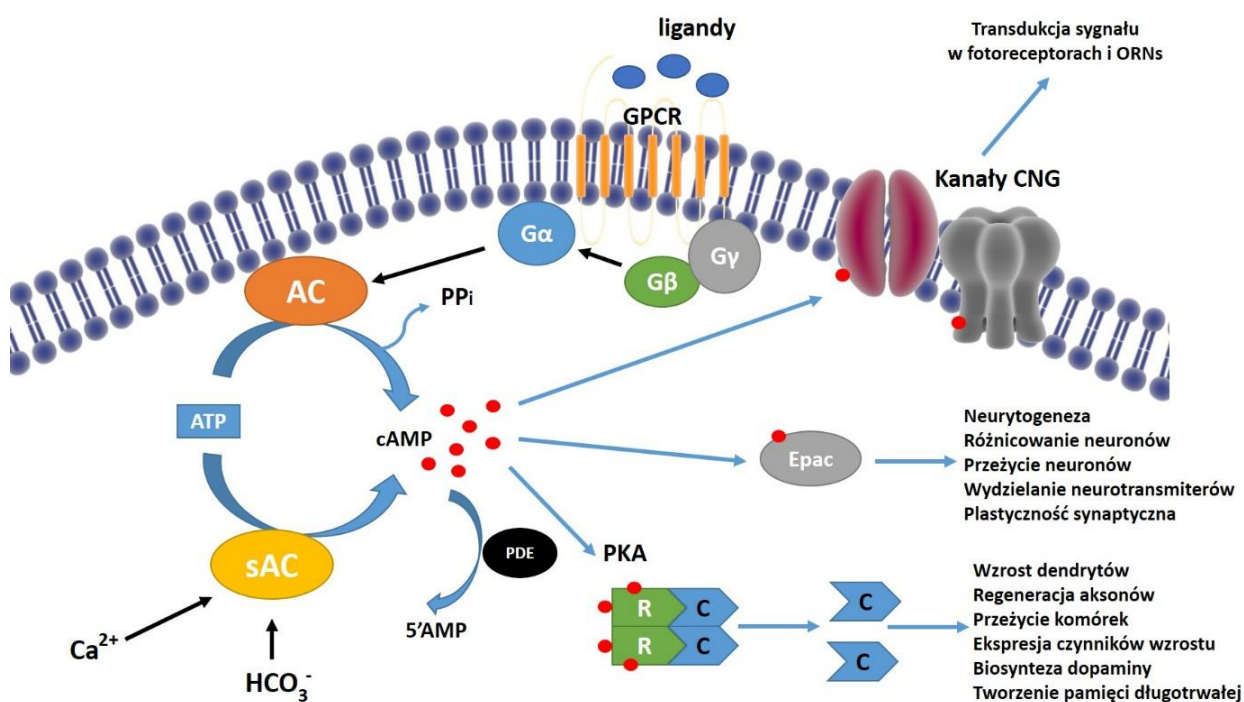
cAMP to cykliczna pochodna adenozy-5'-monofosforanu (AMP, ang. adenosine monophosphate), która jest nukleotydem zbudowanym z adeniny, rybozy i fosforanu. Jest to ważny wewnątrzkomórkowy przekaźnik wtórny uczestniczący w regulacji wielu procesów regulowanych przez hormony (hormon przytarczyc, hormon tyreotropowy, glukagon) oraz neuroprzekaźniki (dopamina, adrenalina, noradrenalina) [146]. Wśród tych procesów można wymienić przeżycie komórek [147], wzrost i różnicowanie [148], neurytogenezę [149], metabolizm komórkowy [146]. Synteza cAMP może zachodzić na drodze zależnej lub niezależnej od białka G (Rysunek 4.6).

W ścieżce sygnałowej zależnej od białka G, po związaniu zewnątrzkomórkowego liganda do GPCR, podjednostka  $G\alpha$  odłącza się od podjednostek  $G\beta$  oraz  $G\gamma$  i aktywuje cyklazę adenylanową (AC, ang. adenylyl cyclase) związaną z błoną komórkową, która przekształca adenylozotryfosforan (ATP, ang. adenosine triphosphate) w cząsteczkę cAMP i pirofosforan ( $PP_i$ , ang. pyrophosphate) [142]. W ścieżce sygnałowej niezależnej od białka G synteza cAMP zachodzi poprzez aktywację rozpuszczalnej AC (sAC, ang. soluble adenylyl cyclase) przez wodorowęglan ( $HCO_3^-$ ) i jony wapnia [150]. Za hydrolizę cAMP odpowiadają fosfodiesterazy (PDEs, ang. phosphodiesterases), które hydrolizują wiązanie estrowe w cAMP do adenylozyny 5'-monofosforanu (5'AMP, ang. adenosine monophosphate). Stężenie wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP jest mocno regulowane przez równowagę między jego syntezą przez cyklazy adenylanowe, a jego hydrolizą przez fosfodiesterazy [151]. W OUN ssaków występuje dziewięć izoform transmembranowych AC i jedna izoforma rozpuszczalna. Wszystkie transmembranowe AC mają taką samą strukturę, ale różne długości łańcuchów polipeptydowych (1080-1353 aa). Składają się z dwóch oddzielnych domen membranowych, pojedynczej N-końcowej domeny i dwóch domen cytoplazmatycznych, które zawierają po dwa miejsca katalityczne [152]. W przypadku PDE u ludzi zidentyfikowano 11 różnych rodzin, a każda z nich zawiera wiele genów i wariantów splicingowych, co daje ponad 100 unikalnych izoform PDE, hydrolizujących cAMP i/lub cGMP. W mózgu, największą grupę stanowi rodzina PDE4, która odpowiada tylko za hydrolizę cAMP, w mniejszej ilości obecne są również PDE1, 2, 3, 7, 8 i 10 [153].

W komórce istnieją trzy główne białka efektorowe dla cAMP: czynnik Epac, kanały jonowe bramkowane cyklicznymi nukleotydami (CNG channels, ang. cyclic nucleotide-gated channels) oraz kinaza PKA [154]. U kręgowców występują dwie izoformy Epac (Epac 1 oraz Epac2), z czego w OUN najbardziej powszechna jest izoforma Epac2. Związanie cAMP przez Epac powoduje odsłonięcie domeny czynnika wymiany nukleotydów guaninowych (GEF, ang. guanine nucleotide exchange factors), do której mogą związać się małe GTPazy Rap, Rap1 i Rap2. Enzymy te hydrolizują guanozyny-5'-trifosforan (GTP, ang. guanosine-5'-triphosphate) do difosforanu guanozyny (GDP, ang. guanosine diphosphate), co aktywuje dalsze szlaki sygnałowe [155]. W OUN białka Epac zaangażowane są w wiele funkcji, w tym w neurytogenezę, różnicowanie i przeżycie neuronów, wydzielanie neurotransmiterów oraz plastyczność synaptyczną [156]. Kolejnym, mniej poznanym efektorom cAMP są kanały jonowe CNG. Obecne są one w mózgu, nerkach, tkankach endokrynych i plemnikach, jednak do tej pory nie wyjaśniono w pełni ich roli. Związanie cAMP z kanałami CNG moduluje ich funkcje, w tym nieselektywny przepływ jonów wapnia, potasu i sodu, co wpływa na potencjał błony komórkowej lub przekazywanie sygnału w neuronach. Kanały jonowe CNG pełnią ważne funkcje w transdukcji sygnałów sensorycznych w fotoreceptorach siatkówki i w neuronach receptora węchowego (ORNs, ang. olfactory receptor neurons) [157], [158].

Główną cząsteczką efektorową dla cAMP jest PKA. Enzym ten, w postaci nieaktywnej jest tetramerem zbudowanym z dwóch podjednostek regulatorowych (R) oraz dwóch podjednostek katalitycznych (C). Występuje on w dwóch izoformach: PKA typu I ( $RI\alpha 2C_2$ ,  $RI\beta 2C_2$ ) oraz PKA typu II ( $RII\alpha 2C_2$ ,  $RII\beta 2C_2$ ) [159]. U ssaków występują cztery rodzaje podjednostki regulatorowej. Podjednostki  $RI\alpha$  i  $RII\alpha$  ulegają ekspresji w całym organizmie ludzkim,  $RI\beta$  występuje głównie w mózgu, jądrach oraz limfocytach B, natomiast podjednostka  $RII\beta$  ekspresjonowana jest w mózgu, komórkach tłuszczowych i tkankach wydzielniczych. Wzrost stężenia cAMP w komórce uruchamia proces aktywacji PKA. Zachodzi on poprzez związanie się cząsteczek cAMP w dwóch miejscach wiążących cAMP zlokalizowanych na każdej z dwóch podjednostek regulatorowych, co powoduje oddysocjowanie podjednostek katalitycznych i aktywację enzymu. Aktywna kinaza PKA może fosforylować reszty seryny i treoniny obecne w białkach posiadających motyw arginina-arginina/lizyna-X-seryna/treonina, gdzie X jest aminokwasem hydrofobowym [142], [160].

Aktywność podjednostki katalitycznej może być zahamowana przez inhibitor kinazy białkowej (PKI, ang. protein kinase inhibitor), który może kierować podjednostkę C do jądra, co blokuje dalsze funkcje PKA. Specyficzność w transdukcji sygnału cAMP zapewniają białka kotwiczące kinazę białkową A (AKAPs, ang. PKA-anchoring proteins), które kontrolują umiejscowienie PKA w pobliżu docelowych efektorów i substratów [154]. Jedną z kluczowych funkcji PKA jest udział w regulacji transkrypcji genów poprzez fosforylację czynników transkrypcyjnych takich jak np. CREB, CREM, ATF1, NF-kB lub SOX9 (ang. SRY-Box Transcription Factor 9) [154]. PKA odgrywa kluczową rolę w OUN poprzez regulację wzrostu dendrytów, regeneracji aksonów, aktywności kanałów wapniowych, biosyntezy dopaminy. Dodatkowo jest zaangażowana w procesy LTP, LTD oraz plastyczności strukturalnej, co związane jest z tworzeniem pamięci długotrwałej [161]. Jednym z ważniejszych czynników aktywowanych przez PKA jest CREB, który reguluje ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w kontrolę procesów przeżyciowych komórek, cyklu komórkowego, metabolizmu oraz ekspresję czynników wzrostu [129].



**Rysunek 4.6. Szlak sygnałowy cząsteczki cAMP.** Powstawanie cAMP regulowane jest poprzez ścieżkę zależną od aktywacji białka G, gdzie podjednostka G $\alpha$  odłącza się od podjednostek G $\beta$  oraz G $\gamma$  i aktywuje AC, która przekształca ATP w cząsteczkę cAMP i PP<sub>i</sub>. Ścieżka druga, niezależna od aktywacji GPCR, obejmuje syntezę cAMP poprzez aktywację sAC przez HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> i Ca<sup>2+</sup>. Za degradację cAMP odpowiada PDE, która hydrolizuje wiązanie estrowe w cAMP, co prowadzi do powstania 5'AMP. Nagromadzony w komórce cAMP może regulować wiele ścieżek sygnałowych poprzez aktywację kanałów CNG, czynnika Epac lub PKA w komórce. Aktywacja PKA polega na związaniu cAMP z dwoma miejscami na każdej z dwóch podjednostek R, co powoduje ich oddzielenie od podjednostek C, które następnie fosforylują reszty seryny i treoniny w substratach białkowych. Na podstawie [142].

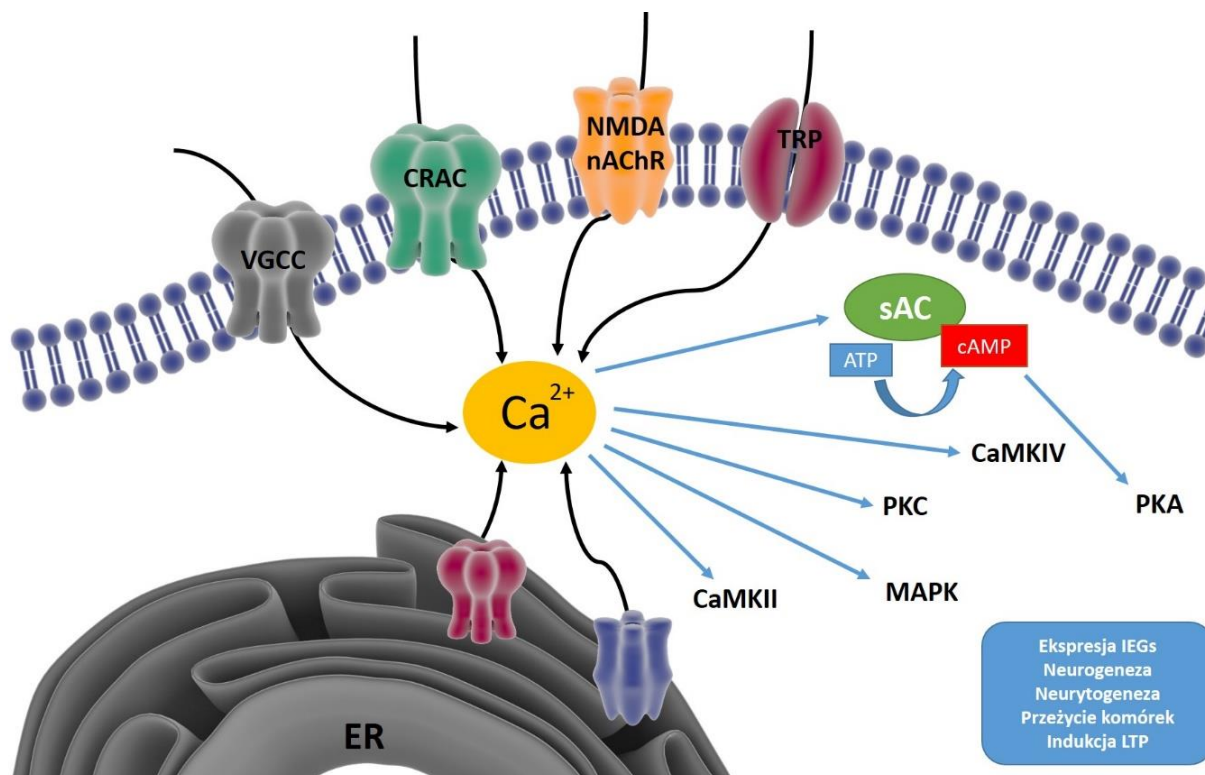
#### 4.5.2. Szlaki sygnałowe zależne od wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia

Jony wapnia są bardzo ważnymi przekaźnikami wtórnymi, które odgrywają istotną rolę dla rozwoju i fizjologii centralnego układu nerwowego [130]. Wewnątrzkomórkowy wzrost poziomu jonów wapnia może zostać osiągnięty poprzez wnikięcie do komórki nerwowej jonów wapnia przez kanały bramkowane ligandem takie jak NMDAR lub receptor nikotynowy acetylocholinowy (nAChR, ang. nicotinic acetylcholine receptor), kanały VGCCs, kanały jonowe z rodziny receptorów przejściowego potencjału (TRP, ang. transient receptor potential) oraz

kanały jonowe aktywowane uwalnianiem wapnia (CRAC, ang. calcium release-activated channels). Poziom jonów w cytoplazmie może również wzrosnąć poprzez uwolnienie jonów wapnia z wewnątrzkomórkowego magazynu - retikulum endoplazmatycznego (ER, ang. endoplasmic reticulum), które dzięki obecności na swojej powierzchni wielu kanałów jonowych oraz receptorów utrzymuje odpowiednie stężenie  $Ca^{2+}$  (Rysunek 4.7) [162].

Jony wapnia są kluczowymi cząsteczkami dla wielu wewnątrzkomórkowych oraz zewnątrzkomórkowych procesów komórkowych. Wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia w neuronach powoduje aktywację kinaz istotnych dla prawidłowego funkcjonowania OUN. Są to kinazy: CaMKII, CaMKIV, cAMP/PKA, MAPK/ERK oraz kinaza białkowa C (PKC, ang. protein kinase C) [163], [164]. Jednym z ważniejszych czynników transkrypcyjnych aktywowanych w kaskadzie indukowanej jonami wapnia jest czynnik CREB. Fosforylacja Ser133 w czynniku CREB, przez kinazy aktywowane wapniem, prowadzi do indukcji ekspresji białek odpowiedzialnych za kontrolę neurogenezy oraz neurytogenezy. Wykazano, że w procesy te może być również zaangażowany BDNF, którego ekspresja wzrasta po aktywacji czynnika CREB w odpowiedzi na wzrost stężenia jonów wapnia w komórce [165]. Szlaki te zaangażowane są również w kontrolę aktywności synaptycznej oraz mechanizmy związane z uczeniem się i zapamiętywaniem, które są jednymi z ważniejszych funkcji jonów  $Ca^{2+}$  w komórkach nerwowych. Kontrola homeostazy wapniowej warunkuje prawidłowe funkcjonowanie centralnego układu nerwowego, pozwala na utrzymanie integralności neuronów oraz ich długoterminowe przeżycie. Zaburzenie tej równowagi może przyczyniać się do aktywacji procesów neurodegeneracyjnych [163].

Zmiany w wewnątrzkomórkowym poziomie jonów wapnia są istotne również dla regulowanego wydzielania pęcherzyków sekrecyjnych zawierających neurotransmitery, hormony, białka oraz mniejsze cząsteczki. Ich zawartość uwalniana jest pod wpływem wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, co prowadzi do fuzji pęcherzyka z błoną komórkową i uwolnienia jego zawartości poza komórkę [166]. Szczególnie ważne dla funkcjonowania układu nerwowego jest uwalnianie neurotransmiterów z pęcherzyków synaptycznych z zakończeń presynaptycznych do szczeliny synaptycznej. Neurotransmitery dyfundują przez szczelinę synaptyczną i wiążą się ze specyficznymi receptorami komórki postsynaptycznej, przekazując sygnał dalej [167]. W wyniku  $Ca^{2+}$ -zależnej egzocytozy do przestrzeni pozakomórkowej wydzielany jest również BDNF, który pod wpływem bodźców zewnętrznych uwalniany jest z pęcherzyka sekrecyjnego, na ścieżce regulowanego wydzielania. Dzieje się tak na skutek napływu jonów wapnia z zewnątrz poprzez kanały VGCC lub NMDAR lub poprzez uwolnienie  $Ca^{2+}$  z wewnątrzkomórkowych magazynów na skutek aktywacji receptorów GPC lub Trk [168].



**Rysunek 4.7. Szlaki prowadzące do wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce.** Wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia może wzrosnąć poprzez wniknięcie  $\text{Ca}^{2+}$  przez kanały VGCCs, CRAC, NMDA, nAChR, TRP lub poprzez uwolnienie jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego. Wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  powoduje dalszą aktywację kinaz: CaMKII, CaMKIV, PKA, MAPK oraz PKC, które aktywują wiele procesów w komórce (wymieniono na Rysunku).

#### 4.5.3. Szlak PI3K/AKT

Kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3Ks, ang. phosphoinositide 3-kinases) należą do rodziny wewnątrzkomórkowych kinaz lipidowych. Ze względu na strukturę oraz selektywność substratową dzielą się na trzy klasy: I, II, III [169]. Związanie się czynnika aktywującego komórkę (cytokiny, czynniki wzrostu lub hormony) do jednego z docelowych receptorów, w tym RTK lub GPCR, powoduje ich aktywację, co prowadzi do rekrutacji PI3K do błony komórkowej (Rysunek 4.8) [170]. Aktywna PI3K katalizuje reakcję fosforylacji fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu ( $\text{PIP}_2$ , ang. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) do (3,4,5)-trifosforanu fosfatydyloinozytolu ( $\text{PIP}_3$ , ang. phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate). Następnie, zwiększona produkcja  $\text{PIP}_3$  rekrutuje do błony komórkowej AKT oraz kinazę 1 zależną od fosfatydyloinozytolu (PDK1, ang. phosphoinositide-dependent kinase-1), która fosforyluje AKT. PI3K należące do klasy I zaangażowane są w kontrolę proliferacji i przeżycia komórek [171], regulację plastyczności neuronalnej w mózgu (metabolizm insuliny) [172], funkcje immunologiczne [173] oraz stan zapalny [174]. PI3K klasy II zaangażowane są w regulację transportu pęcherzyków błonowych [175], natomiast kinazy klasy III regulują autofagię oraz metabolizm mitochondrialny [176].

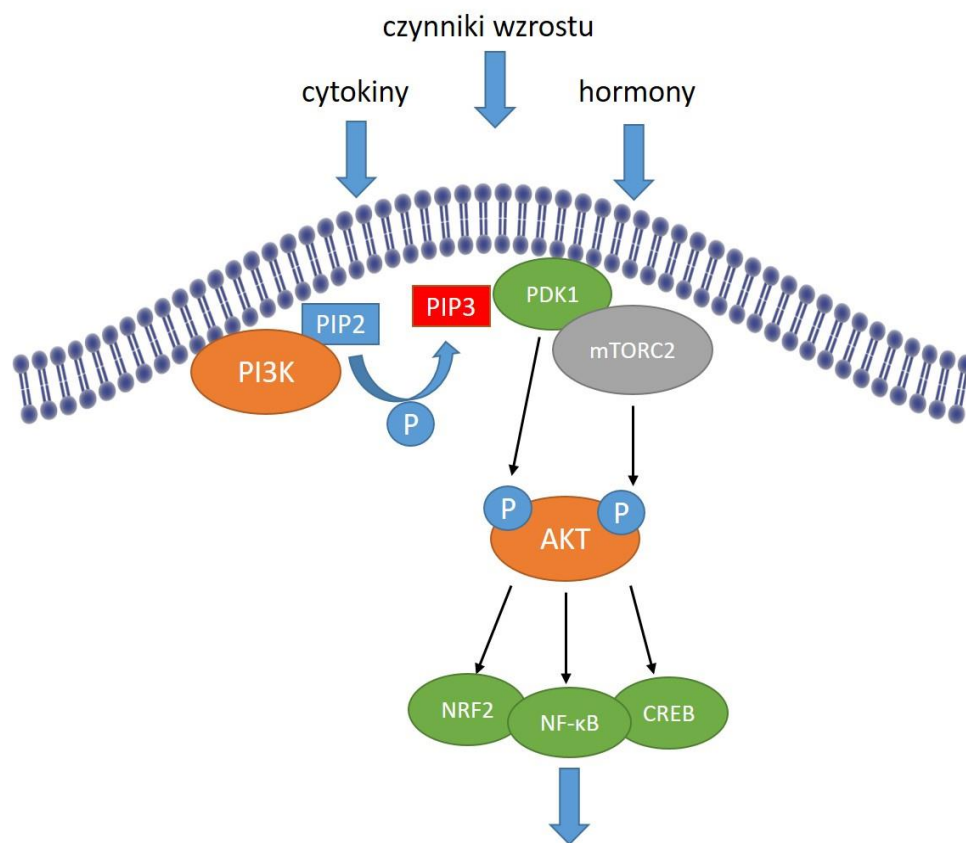
AKT jest głównym efektem PI3K w komórkach nerwowych. AKT jest kinazą serynowo-treoninową, która występuje w postaci trzech izoform: AKT1, AKT2 oraz AKT3. Izoforma AKT1 u ludzi ulega ekspresji we wszystkich tkankach ciała, natomiast AKT2 obecna jest w komórkach mięśni szkieletowych oraz w komórkach tkanki tłuszczowej. Ekspresja AKT3 zachodzi w mózgu, jądrach, sercu, nerkach, płucach i mięśniach szkieletowych [177]. Każda z izoform posiada



w swojej strukturze trzy domeny: N-końcową domenę PH (ang. pleckstrin homology domain), domenę centralną oraz C-końcową domenę regulatorową. Domena PH warunkuje translokację enzymu do błony komórkowej, warunkującą jego aktywację. Struktura domeny katalitycznej zawiera miejsce wiązania ATP oraz resztę treoniny (AKT1 – Thr308, AKT2 – Thr309, AKT3 – Thr308), która jest fosforylowana przed PDK1 [178]. Do pełnej aktywacji AKT potrzebna jest jeszcze fosforylacja reszty seryny znajdującej się w domenie regulatorowej (AKT1 – Ser473, AKT2 – Ser474, AKT3 – Ser472), co może zachodzić dzięki białkowemu kompleksowi mTORC2 (ang. mammalian target of rapamycin complex 2), kinazie białkowej zależnej od DNA (DNA-PK, ang. DNA-dependent protein kinases) lub kinazom związanym z integrzynami (ILK, ang. integrin-linked kinase) [179]–[181].

AKT jest centralnym mediatorem ścieżki aktywowanej przez PI3K i przekazuje sygnał do kolejnych substratów białkowych, które wpływają na kluczowe procesy komórkowe. Kinaza reguluje wiele procesów dzięki aktywacji czynników transkrypcyjnych kontrolujących ekspresję wielu genów. Wśród nich wyróżnia się jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2 (NRF2, ang. nuclear factor erythrocyte two related factor), NF-κB oraz CREB [182]–[184]. W następstwie ekspresji ulega białko związane z kontrolą LTP i wzrostu komórek, takie jak ssaczy cel rapamycyny (mTOR, ang. mammalian target of rapamycin kinase) [185], [186], a także białka zaangażowane w cykl komórkowy, w tym czynnik transkrypcyjny c-Myc oraz cyklina D1 [187]. AKT hamuje ekspresję białek pro-apoptycznych BAD (ang. BCL2 associated agonist of cell death) i BIM (ang. Bcl-2-like protein 11), aktywność kaspazy 9 (ang. caspase-9) oraz degradowuje komórkowy antygen nowotworowy p53 (p53, ang. cellular tumor antigen p53), dzięki czemu promuje przeżycie komórek [188]. AKT blokuje również aktywność kinazy syntazy glikogenu-3 (GSK3, ang. glycogen synthase kinase-3 beta), co wpływa na metabolizm glukozy, przeżycie komórek oraz wzrost aksonów [189], [190].

Ścieżka sygnałowa zależna od aktywacji kinaz PI3K/AKT odgrywa bardzo ważną rolę w regulacji funkcji ośrodkowego układu nerwowego. Szlak ten jest zaangażowany w kontrolę przeżywalności komórek, autofagię, neurogenezę, proliferację komórek oraz plastyczność synaptyczną. Wyniki badań ostatnich lat wykazały, że wiele produktów pochodzenia naturalnego, takich jak kurkumina oraz ginsenozydy, których działanie oparte jest na aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od kinaz PI3K/AKT, chroni neurony dopaminergiczne, neurony hipokampa oraz neurony korowe przed skutkami stresu oksydacyjnego i neurotoksyczności wywołanej Aβ. Ich działanie neuroprotekcyjne wiązało się z aktywacją szlaku PI3K/AKT/CREB, co powodowało zwiększoną ekspresję *Bdnf* [177].



**Przeżycie i wzrost komórek, proliferacja, neurogeneza, wzrost aksonów, autofagia, plastyczność synaptyczna, metabolizm glukozy**

**Rysunek 4.8. Aktywacja szlaku zależnego od PI3K.** Aktywacja kinaz PI3K zachodzi w odpowiedzi na cytokiny, czynniki wzrostu lub hormony. Prowadzi to do rekrutacji do błony komórkowej PI3K, która dalej katalizuje reakcję fosforylacji PIP<sub>2</sub> do PIP<sub>3</sub>. Zwiększona produkcja PIP<sub>3</sub> rekrutuje do błony komórkowej PDK1, która wraz z kompleksem białkowym mTORC2 fosforyluje kinazę AKT. Fosforylacja AKT prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych, w tym czynnika NRF2, NF-κB oraz CREB, kontrolujących ekspresję genów kodujących białka kluczowe dla funkcjonowania komórek nerwowych.

#### 4.5.4. Szlak związany z kinazami MAP

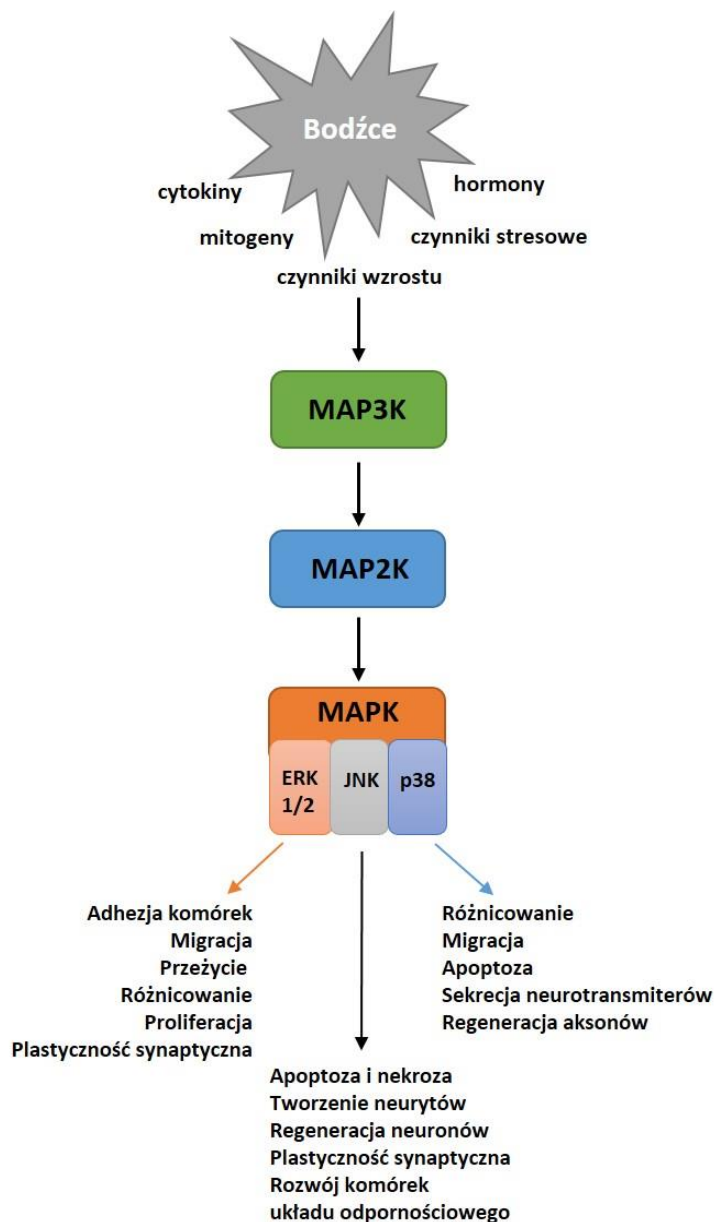
Kinazy białkowe aktywowane mitogenami (MAPKs, ang. mitogen-activated protein kinase) są to kinazy serynowo-treoninowe (Ser/Thr), które odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi komórki na sygnały zewnątrzkomórkowe, takie jak czynniki wzrostu, mitogeny, cytokiny prozapalne, ligandy receptora GPC oraz stres komórkowy. Kinazy MAP posiadają motyw Thr-X-Tyr, którego fosforylacja w obrębie jego domeny kinazowej warunkuje ich aktywację [191], [192]. Kinazy MAP można podzielić na dwie grupy: grupę kinaz klasycznych (konwencjonalnych), których budowa oraz schemat działania jest taki sam oraz grupę niespecyficznych kinaz nieklasycznych. W grupie kinaz klasycznych wyróżnia się: rodzinę kinaz regulowanych zewnątrzkomórkowo 1/2 oraz 5 (ERK1/2, ERK5 ang. extracellular signal-regulated kinase 1/2, 5) posiadających motyw Thr-Glu-Tyr, rodzinę kinaz p38 (α, β, γ, δ) posiadających motyw Thr-Gly-Tyr oraz kinazy aktywowane stresem 1/2/3 (JNK1/2/3, ang. c-Jun N-terminal kinase family/stress-activated protein kinase 1/2/3) posiadające motyw Thr-Pro-Tyr. Kinazy nieklasyczne to ERK3/4, ERK7 oraz kinaza podobna do nemo (NLK, ang. nemo-like kinase) [193], [194]. Kaskada sygnałowa klasycznych kinaz MAP zbudowana jest z co najmniej trzech sekwencyjnie działających kinaz: MAP3K, MAP2K oraz MAPK. Aktywacja MAP3K przez czynniki zewnętrzne prowadzi do aktywacji MAP2K poprzez fosforylację jej reszt seryny i treoniny, która

następnie stymuluje aktywność MAPK poprzez podwójną fosforylację reszt treoniny (Thr) i tyrozyny (Tyr) w konserwatywnym motywie Thr-X-Tyr. Następnie aktywowane MAPK przekazują sygnały do różnych cząsteczek efektorowych (Rysunek 4.9) [195].

Kinazy p38 oraz JNK aktywowane są w wyniku sytuacji stresowych takich jak infekcje, stany zapalne, stres oksydacyjny lub osmotyczny, uszkodzenie DNA, a także czynniki wzrostowe. Receptorami tych sygnałów są zazwyczaj receptory Wnt, receptor TGF- $\beta$ , receptor TNF, receptory toll-podobne (TLR, ang. toll-like receptor), receptor GPC oraz RTK [196], [197]. Substratami dla kinazy JNK są: czynnik transkrypcyjny ATF2, czynnik transkrypcyjny Myc, czynnik transkrypcyjny Sp1 oraz podjednostka czynnika transkrypcyjnego AP-1 (c-JUN, ang. transcription factor AP-1 subunit Jun) [198]. Aktywacja szlaków zależnych od kinazy JNK bierze udział w procesach degradacji białek, apoptozie oraz nekrozie, ale także w rozwoju komórek układu odpornościowego, tworzeniu neurytów i plastyczności synaptycznej oraz regeneracji neuronów [199], [200]. Natomiast substratami dla p38 są czynniki transkrypcyjne takie jak ATF1/2, c-Myc, ELK1 oraz CREB. Dzięki aktywacji tych czynników p38 reguluje różne funkcje komórki, w tym metabolizm, różnicowanie, migrację komórek, sekrecję neurotransmiterów, regenerację aksonów, a także apoptozę [201], [202].

ERK1 oraz ERK2 to najlepiej poznane kinazy z rodziny ERK, należące do grupy kinaz klasycznych. Posiadają one sekwencję aminokwasową zgodną w 84% i dzielą wiele wspólnych fizjologicznych oraz biologicznych funkcji, w komórce aktywowane są równocześnie. Kaskadę kinaz ERK1/2 może aktywować szeroka gama bodźców zewnątrzkomórkowych. Mogą to być czynniki wzrostu (NGF, EGF, BDNF), hormony (insulina, bradykinina), a także cytokiny (IL-6, IL-17, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) czy stres osmotyczny, które aktywują receptory z rodziny RTK, GPC, TLR lub receptor TNF $\alpha$  [191], [203]. W konsekwencji aktywacji ulegają kinazy białkowe MEK1/2 (MAP2K) które bezpośrednio fosforylują i aktywują ERK1/2 [204]. Po aktywacji fosfo-ERK1/2 mogą przemieszczać się do jądra komórkowego, aby aktywować szereg czynników transkrypcyjnych, w tym ELK1, c-Myc, c-Fos czy CREB. Mogą też pozostać w cytoplazmie, gdzie regulują szereg innych procesów [203].

ERK1/2 biorą udział w regulacji wielu procesów takich, jak adhezja komórek, migracja, przeżycie, różnicowanie, proliferacja oraz metabolizm [205]. Kinazy te występują w mózgu w dużych ilościach, dlatego ich aktywacja jest bardzo istotna dla rozwoju OUN, kontroli procesów pamięci i uczenia się oraz plastyczności synaptycznej [204].



**Rysunek 4.9. Szlak sygnałowy kinaz MAP.** Cytokiny, mitogeny, czynniki wzrostu, czynniki stresowe oraz hormony aktywują kaskadę sygnałową klasycznych kinaz MAP, która zbudowana jest z co najmniej trzech sekwencyjnie działających kinaz: MAP3K, MAP2K oraz MAPK. Do grupy klasycznych i najpopularniejszych kinaz MAP należą ERK1/2, JNK oraz p38, które aktywują szlaki zaangażowane w procesy związane z przeżyciem jak i śmiercią komórki.

#### 4.6. Nutraceutyki

Profilaktyka zdrowotna jest bardzo ważnym elementem ochrony zdrowia, pomaga w zapobieganiu chorobom i uczestniczy w obronie naszego organizmu przed potencjalnie szkodliwymi czynnikami oraz substancjami. Ważną rolę pełni tutaj żywność funkcjonalna oraz nutraceutyki. Żywność funkcjonalna jest to żywność prozdrowotna, która posiada udokumentowany, pozytywny wpływ na poprawę naszego zdrowia lub obniża ryzyko wystąpienia danej choroby [206]. Nutraceutyki to pojęcie wprowadzone przez doktora Stephena DeFelice, powstałe z połączenia słów: „nutrition” (odżywianie) oraz „farmaceutical” (farmaceutyczny) [207]. Są to biologicznie aktywne substancje, które mogą występować w żywności funkcjonalnej lub osobno (w postaci tabletek, odżywek, dodatków żywnościowych, syropów, proszków) oraz posiadają udowodniony korzystny wpływ na zdrowie poprzez wzmacnianie, modyfikowanie lub

osłabianie funkcji fizjologicznych i metabolicznych organizmu. Ważną cechą nutraceutyków jest ich naturalne pochodzenie np. zwierzęce, roślinne lub mikrobiologiczne. Najczęściej nutraceutyki pozyskuje się z ziół, ekstraktów roślinnych, owoców, produktów pszczelich, siary oraz jaj [206], [208].

Z surowców roślinnych otrzymuje się witaminy, minerały, barwniki oraz nienasycone kwasy tłuszczowe. Istotną grupę stanowią przeciwutleniacze, które mają ogromne znaczenie dla procesów starzenia organizmu, w tym układu nerwowego, poprzez niszczenie wolnych rodników [208]. Bogatym źródłem nutraceutyków pochodzenia zwierzęcego są owoce morza, z których pozyskuje się przede wszystkim wielonienasycone kwasy tłuszczowe, karotenoidy, polisacharydy i ich pochodne (chityna, glukozamina), witaminy oraz minerały. Związki te wykazują wiele właściwości przeciwutleniających, przeciwzapalnych, przeciwalergiczych oraz hamujących otyłość [209]. Nutraceutykami są również bakterie probiotyczne np. bakterie kwasu mlekowego. Są one istotne dla poprawy funkcjonowania układu pokarmowego, ułatwiają absorbcję wielu cennych składników z pokarmu i tym samym redukują objawy wielu chorób jak np. cukrzyca czy otyłość, które negatywnie wpływają na procesy starzenia organizmu [210].

Zainteresowanie żywnością funkcjonalną oraz nutraceutykami bardzo wzrosło na przestrzeni ostatnich lat. Nutraceutyki polecane są szczególnie w diecie osób z ograniczoną zdolnością do przyswajania cennych substancji z produktów spożywczych. Jednak wyniki badań z ostatnich lat sugerują, że stosowanie nutraceutyków może przynieść korzyści każdemu, ponieważ skutkuje to obniżeniem ryzyka rozwoju nowotworów, chorób układu krążenia w tym zawału serca, zapalenia stawów, zaćmy czy może opóźnić procesy starzenia się organizmu [208], [211].

#### **4.7. Kompleks peptydowy wyizolowany z żółtka jaja kurzego – yolkina**

Wyniki wieloletnich badań nad ptasimi jajami pokazały, że są one bardzo dobrym surowcem dla pozyskiwania nutraceutyków. Jaja są komórkami rozrodczymi, z których powstaje w pełni wykształcone pisklę. Z tego względu w swoim składzie posiadają wszystkie niezbędne substancje do jego wzrostu i ochrony. Jaja są tanim i łatwo dostępnym materiałem, będącym rezerwuarem wielu ważnych substancji o rozmaitych właściwościach. Skorupa z błoną podskorupową zawiera łatwo dostępny wapń w postaci węglanu wapnia, a także wiele innych mikroelementów. Białko jaj to charakterystyczny układ koloidalny, który nie posiada lipidów, a składa się głównie z wody (ok. 88%) oraz białek. Najważniejszymi proteinami białka jaja są: owoalbumina, owotransferyna, lizozym, cystatyna, oraz awidyna. Żółtko stanowi kluczowy materiał budulcowy i odżywczy dla rozwijającego się zarodka. Jest ono przede wszystkim źródłem lipidów (głównie fosfolipidów) oraz białek (apolipoproteiny B, witellogeniny, owalbuminy, owotransferyny), a także węglowodanów, soli mineralnych oraz witamin. Składniki te są rozmieszczone w nierozpuszczalnych agregatach białkowych zwanych granulami oraz w żółtym płynie zwanym plazmą. Udowodniono, że substancje zawarte w jajach posiadają właściwości immunomodulacyjne, przeciwbakteryjne, przeciwutleniające, antynowotworowe oraz neuroprotektoryjne [206], [212], [213].

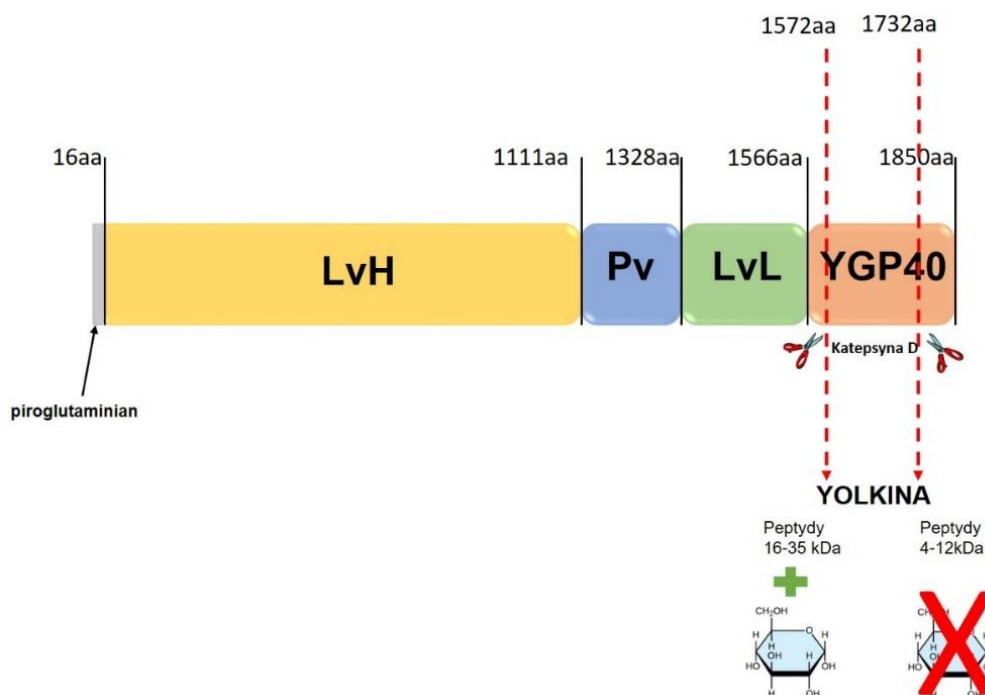
Spośród wielu cennych nutraceutyków zawartych w jajach można wyróżnić cholinę, która występuje w postaci fosfatydylocholicy. Mimo, iż możemy ją pozyskiwać na drodze syntezy endogennej, nie wystarcza to do zaspokojenia potrzeb naszego organizmu i musimy dostarczać ją wraz z pożywieniem. Jaja są jednym z jej głównych źródeł, w żółtku jej stężenie wynosi 680mg/100g [213]. Cholina pełni ważną rolę w funkcjonowaniu oraz wzroście komórek. Jest niezbędna w metabolizmie grup metyloowych istotnych dla regulacji ekspresji genów, syntezie neuroprzekazników oraz błon i w transporcie lipidów. Ze względu na swoje cenne właściwości

Rada ds. Żywności i Żywienia Amerykańskiego Instytutu Medycyny uznała cholinę za jeden z najbardziej niezbędnych składników odżywczych zalecanych w diecie od 1998 roku [214], [215].

Innym istotnym nutraceutykiem-białkiem jest immunoglobulina Y (IgY, ang. immunoglobulin Y), która jest kluczowa dla ochrony rozwijającego się w jaju zarodka. Główną rolą IgY jest wywołanie biernej odpowiedzi immunologicznej oraz utrzymanie tej odpowiedzi do momentu nabycia przez zarodek zdolności do wytwarzania przeciwciał. U ptaków matczyne IgY pochodzą z krwi i wbudowane są w żółtko dojrzewających oocytów, a następnie przenoszone są do krążenia embrionalnego przez błonę woreczka żółtkowego [216]. Jedna kura jest w stanie wyprodukować od 20 do 40 g IgY rocznie, więc jest dobrą alternatywą dla produkcji przeciwciał z wykorzystaniem innych zwierząt np. królików. Produkcja ptasich przeciwciał z żółtek jaj kurzych w prosty i wydajny sposób dostarcza doskonałego narzędzia wykorzystywanego w wielu dziedzinach immunologii i nie tylko. IgY są z sukcesem stosowane w immunohistochemii, immunocytochemii oraz w testach immunoenzymatycznych lub immunochromatograficznych [217]. Stanowią dobrą alternatywę dla standardowych terapii antybiotykowych i przeciwwirusowych ze względu na swoje właściwości. Dodatkowo wykazano, że IgY posiadają aktywność przeciwgrzybiczą, przeciw pasożytniczą oraz antyalergiczną, a także mają działanie odtruwające i przeciwnowotworowe [218].

Dekadę temu odkryto, że IgY wyizolowanej z żółtka jaja kurzego towarzyszy aktywna immunologicznie frakcja polipeptydowa, którą nazwano yolkiną [219], [220]. Analiza elektroforetyczna yolki wykazała obecność peptydów o masie cząsteczkowej rzędu 1-35 kDa, które bogate są w aminokwasy kwasowe Asp/Asn oraz Glu/Gln, i ubogie w metioninę. Analiza sekwencji aminokwasowej *N*-końcowego fragmentu yolki wykazała homologię do *C*-końcowego fragmentu białka witellogeniny II (VtgII, ang. vitellogenin II). Wykazano, że peptydy yolki o masie większej niż 16 kDa są glikoproteinami, a ich sekwencja aminokwasowa odpowiada sekwencji witellogeniny II, rozpoczynając od pozycji alaniny 1572. Natomiast mniejsze peptydy o masie od 4 do 12 kDa nie posiadają reszt cukrowych, a ich *N*-koniec odpowiada pozycji metioniny 1732 w witellogeninie II [220].

Witellogeniny (Vtgs, ang. vitellogenins) są multidomenowymi apolipoproteinami, które należą do nadrodziny dużych białek przenoszących lipidy (LLTP, ang. large lipid transfer protein). U kręgowców, witellogenina zbudowana jest z sygnału peptydowego (piroglutaminian), ciężkiego łańcucha lipowiteliny (LvH, ang. heavy chain lipovitellin), foswitiny (Pv, ang. phosvitin), lekkiego łańcucha lipowiteliny (LvL, ang. light chain lipovitellin) oraz z dwóch regionów bogatych w reszty cystein ( $\beta'$  i CT), które są homologiczne do domeny D czynnika von Willebranda u ssaków (Vwfd, ang. von Willebrand factor type D domain) [221]. W przypadku drobiu, *C*-końcowy region homologiczny do Vwfd nie ulega trawieniu do podjednostek  $\beta'$  i CT, lecz pozostaje nietknięty jako 40 kDa glikoproteina żółtka (YGP40, ang. yolk glycoprotein of 40 kDa), która zostaje uwolniona dzięki działaniu katepsyny D. Vtgs są prekursorami większości białek w żółtku jaj kręgowców i bezkręgowców. Ich synteza zachodzi w wątrobie u osobników płci żeńskiej w wyniku skoordynowanej kaskady endokryn, która angażuje mózg, jajniki, wątrobę oraz krążenie systemowe. Produkcja witellogeniny u osobników płci męskiej jest możliwa w wyniku stymulacji estrogenami. Wyróżnia się trzy rodzaje kurzych witellogenin (VtgI, VtgII, VtgIII), które różnią się między sobą sekwencją, masą oraz właściwościami immunologicznymi [222]. VtgI (210,6 kDa) oraz VtgII (204,8 kDa) występują w największej ilości w żółtku jaj oraz są dużo większe od VtgIII (38,1 kDa), która składa się głównie z foswitiny [223]. Głównie dzięki aktywności enzymatycznej katepsyny D witellogenina staje się źródłem wielu białek obecnych w żółtku jaja, w mniejszym stopniu odpowiada za to katepsyna B oraz katepsyna L [224]. Schematyczny rysunek budowy witellogeniny oraz pochodzącej z niej yolki przedstawiono na Rysunku 4.10.



**Rysunek 4.10. Witellogenina II jako źródło kompleksu peptydowego yolkina.** U kregowców, witellogenina II zbudowana jest z sygnału peptydowego (piroglutaminian), ciężkiego łańcucha lipowiteliny (LvH), foswityny (Pv), lekkiego łańcucha lipowiteliny (LvL) oraz domeny YGP40. Głównie dzięki aktywności enzymatycznej katepsyny D witellogenina II staje się źródłem wielu protein żółtkowych, prawdopodobnie również yolkiny. C-koniec witellogeniny jest źródłem peptydów yolkiny, których N-koniec odpowiada pozycji 1572aa lub 1732aa w łańcuchu polipeptydowym witellogeniny II. Peptydy yolkiny o wielkości 16-35 kDa to glikoproteiny, natomiast te o wielkości 4-12 kDa są wolne od reszt cukrowych. Schemat budowy witellogeniny II opracowano na podstawie [222].

#### 4.7.1. Właściwości immunoregulatorowe yolkiny

Ptasie immunoglobuliny Y uważane są za ewolucyjnego prekursora immunoglobulin G i E, swoistych dla układu immunologicznego ssaków. Wyniki wcześniejszych badań wykazały obecność w siarce owiec kompleksu polipeptydowego bogatego w prolinę (PRP, ang. proline-rich polypeptide complex), występującego jako frakcja towarzysząca immunoglobulinom IgG<sub>2</sub> [225]. Kompleks PRP wykazywał właściwości immunoregulatorowe, neuroprotektoryjne oraz prokognitywne [226], [227]. Podczas oczyszczania kurzej IgY również uzyskano frakcję (nazwaną później yolkiną) wykazującą obecność peptydów o masie cząsteczkowej od 1 do 35 kDa. Badania wstępne przeprowadzone na modelu komórek pełnej krwi ludzkiej *ex vivo* wykazały, że aktywność biologiczna nieoczyszczonej frakcji IgY silniej stymulowała komórki pełnej krwi do wydzielania czynnika martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ , ang. tumor necrosis factor) oraz interleukiny 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , ang. interleukin-1 $\beta$ ) niż IgY oczyszczone techniką chromatografii żelowej, pozbawione dodatkowej frakcji peptydowej [219], [220]. Kolejne badania skupiały się nad ulepszeniem metody izolacji i oczyszczania kompleksu oraz pozwoliły na dalszą charakterystykę nowo odkrytego kompleksu peptydowego yolkina.

Wykazano, że komórki pełnej krwi ludzkiej stymulowane yolkiną wydzielały cytokiny prozapalne (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) oraz antyzapalną interleukinę 10 (IL-10, ang. interleukin 10). Yolkiną pobudzała również makrofagi mysiej linii J774.2 do produkcji NO [219], [220], [228]. Kolejne badania wykazały, że obecność reszt cukrowych nie wpływa na immunoregulatorową aktywność yolkiny. Ponadto, deglikozylowana yolkiną wykazywała lepszą zdolność do indukcji tlenku azotu w komórkach BMDM [229].

Starzeniu towarzyszą zmiany w funkcjonowaniu układu odpornościowego. Zwiększa się podatność na przewlekłe infekcje, które mają negatywny wpływ na jakość życia osób starszych. Biorąc pod uwagę, że makrofagi odgrywają kluczową rolę w regulacji procesów odpowiedzi wrodzonej przeprowadzono badania oceniające wpływ yolki na dojrzewanie oraz funkcje mysich makrofagów pochodzenia szpikowego linii BMDM. Wykazano, że yolki ma znaczący wpływ na regulację układu immunologicznego oraz pobudza mysie makrofagi do wydzielania czynników działających przeciwwirusowo. W odpowiedzi na yolki obserwowano zwiększoną ekspresję markerów powierzchniowych CD80 oraz CD86, które odgrywają istotną rolę w początkowej odpowiedzi zapalnej na patogeny. Wzrastała też ekspresja oraz poziom wydzielanych cytokin pro- i antyzapalnych: TNF $\alpha$ , interferonów  $\alpha/\beta$  (IFN  $\alpha/\beta$ , ang. alpha/beta interferons), IL-6, IL-10 oraz transformującego czynnika wzrostu beta (TGF $\beta$ , ang. transforming growth factor beta). Ekspresja cytokin zależna była od aktywacji kinaz ERK1/2, JNK oraz PI3K/AKT przez yolki. Ponadto, yolki pobudzała komórki BMDM do produkcji i wydzielania tlenu azotu w odpowiedzi na indukcję ekspresji indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS, ang. inducible nitric oxide synthase) [230], [231].

Kolejne badania przeprowadzone na myszach wykazały, że yolki może wpływać na rozwój odpowiedzi immunologicznej oraz na fenotyp komórek w narządach limfatycznych. Zaobserwowano wzrost rekrutacji dojrzałych limfocytów B w szpiku kostnym oraz w śledzionie, natomiast w grasicy obserwowano wzrost proliferacji limfocytów T CD4+ oraz CD8+. Zwiększona proliferacja mogła wiązać się ze zwiększoną ekspresją kinaz ERK1/2, JNK1,2,3 oraz p38, obserwowaną po stymulacji yolki w komórkach ludzkiej linii limfocytów T (Jurkat) [232]. Wykazano również, że frakcji IgY wyizolowanej z żółtek jaj innych gatunków ptaków, takich jak gęś, gołąb, kaczka oraz przepiórka, towarzyszył kompleks peptydowy będący odpowiednikiem kurzej yolki. Analiza elektroforetyczna wykazała, że uzyskane preparaty yolkinowe, pomimo różnic w swoim składzie peptydowym, posiadały zdolność do stymulacji ludzkich komórek pełnej krwi do wydzielania cytokin pro-zapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) oraz anty-zapalnej IL-10 [233].

#### **4.7.2. Właściwości pro-kognitywne yolki**

Badania wskazują, że niektóre białka o właściwościach immunoregulatorowych mogą odgrywać istotną rolę w ochronie i regulacji funkcji centralnego układu nerwowego [234]–[236]. W związku z tym zbadano wpływ yolki na funkcje poznawcze zwierząt. Pierwsze wyniki badań wykazały, że myszy z eksperymentalnym modelem choroby Alzheimera, które otrzymywały preparat yolki doustnie uzyskały lepsze wyniki testów behawioralnych, oceniających zdolność uczenia się i zapamiętywania. Preparat yolki (20  $\mu$ g yolki w 0,1% wodnym roztworze albuminy) podawano od 4 do 10 miesiąca życia myszy, następnie oceniano ich funkcje poznawcze za pomocą testu z labiryntem wodnym Morrisa (MWM, ang. Morris water maze). Myszy otrzymujące preparat yolki wypadły lepiej w teście behawioralnym w porównaniu do myszy otrzymujących placebo. Nieco słabszy i nieistotny statystycznie efekt obserwowano u myszy, gdzie yolki podawana była dootrzewnowo w dawce 100  $\mu$ g/mysz przez okres jednego miesiąca [237]. Kolejne badania oceniające wpływ yolki na funkcje poznawcze szczurów wykazały, że yolki zwiększała ich aktywność lokomotoryczną oraz poprawiała ich zdolność uczenia się oraz zapamiętywania [238]. Preparat yolki podawano szczurom dootrzewnowo lub doustnie w dawkach 10  $\mu$ g oraz 100  $\mu$ g na kilogram masy ciała szczura przez 17 dni. Do oceny zmian poznawczych wykorzystano test otwartego pola (OF, ang. open field), labirynt wodny Morrisa oraz test rozpoznawania nowego obiektu (NOR, ang. novel object recognition). Wyniki badań wykazały, że yolki znacząco poprawiała pamięć przestrzenną i epizodyczną u starszych szczurów. Zauważono u nich wzrost czasu eksploracji nowego obiektu w porównaniu z obiektem starym (test



NOR) oraz wyższą skuteczność w lokalizacji strefy docelowej w teście z użyciem labiryntu wodnego Morrisa. Dodatkowo lepsze efekty uzyskano w przypadku, gdy yolkinę podawano dootrzewnowo.

Przeprowadzone dotychczas badania potwierdzają korzystny wpływ preparatu yolkina na poprawę funkcji pamięciowych i poznawczych u zwierząt. Stąd, ważnym celem kolejnych badań stało się wyjaśnienie molekularnego mechanizmu jej działania. Wykazanie wielokierunkowego, neuroprotekcijnego działania yolkiny, skutkującego m. in. istotną poprawą funkcji pamięciowych i poznawczych, stanowić będzie istotny aspekt dla rozwoju dalszych badań mających na celu zastosowanie yolkiny, jako nutraceutyku o działaniu m.in. nootropowym.

## 5. Cel pracy

Starzenie się jest złożonym, wieloczynnikowym oraz naturalnym procesem, który charakteryzuje się spadkiem czynności fizjologicznych i zdolności behawioralnych. Jest to proces nieodwracalny, a rosnąca średnia długość życia sprawia, że starzejące się społeczeństwo stanowi duży, wciąż rosnący odsetek całej populacji. Jednym z działań prozdrowotnych jest stosowanie nutraceutyków, które są naturalnymi substancjami biologicznie aktywnymi. Bardzo dobrym ich źródłem są ptasie jaja, które zawierają wiele cennych substancji, niezbędnych do wzrostu i ochrony rozwijającego się zarodka. Dekadę temu odkryto, że IgY wyizolowanej z żółtka jaja kurzego towarzyszy yolkina - aktywna immunologicznie frakcja peptydowa o masie cząsteczkowej 1-35 kDa. Wyniki badań oceniających wpływ yolki na funkcje poznawcze u myszy z eksperymentalnym modelem choroby Alzheimera oraz u starzejących się szczurów wykazały, że yolkina poprawiła zdolność uczenia się i zapamiętywania u tych zwierząt. Do tej pory nie poznano dokładnego mechanizmu działania yolki w regulacji funkcji centralnego układu nerwowego, który wyjaśniłby jej właściwości obserwowane w badaniach na zwierzętach, dlatego celem niniejszej pracy było:

- scharakteryzowanie preparatu peptydowego yolki
- zbadanie wpływu yolki na wydzielanie białka BDNF przez komórki neuropodobne linii PC12 oraz unieśmiertelnione komórki hipokampa H19-7
- zbadanie wpływu yolki na aktywację szlaków sygnałowych, które mogą prowadzić do aktywacji czynnika CREB i ekspresji *Bdnf* w komórkach PC12 oraz H19-7
- zbadanie wpływu yolki na morfologię komórek PC12 oraz H19-7
- zbadanie aktywności przeciwutleniającej yolki oraz jej wpływu na regulację systemu antyoksydacyjnego
- zbadanie działania yolki w obecności agregatów A $\beta$

## 6. Materiały i metody

### 6.1. Odczynniki chemiczne i reagenty

<b>1,1,1,3,3,3-heksafluoropropanol (HFIP)</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>2,4,6-tripirydylo-S-triazyna (TPTZ)</b>	Fluka, Buchs, Szwajcaria
<b>3,3',5,5'-Tetrametylobenzydyna (TMB)</b>	Serva, Heidelberg, Niemcy
<b>acetonitryl</b>	Merck, Darmstadt, Niemcy
<b>adenozyna</b>	Sigma, Steinheim, Niemcy
<b>aldehyd glutarowy</b>	Roth, Karlsruhe, Niemcy
<b>bezwodnik octowy</b>	POCh, Gliwice, Polska
<b>bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2-5-difenylo-tetrazoliowy (MTT)</b>	Sigma, Saint Louis, USA
<b>bufor fosforanowo-cytrynianowy pH 5,0</b>	IITD PAN, Wrocław, Polska
<b>bufor obciążający Laemmlis, 4X</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>buforowana fosforanem sól fizjologiczna (PBS)</b>	IITD PAN, Wrocław, Polska
<b>chlerek błękitu nitrotetrazoliowego (NBT)</b>	Roth, Karlsruhe, Niemcy
<b>chlerek potasu (KCl)</b>	POCh, Gliwice, Polska
<b>chlerek sodu (NaCl)</b>	POCh, Gliwice, Polska
<b>chlerek wapnia (CaCl<sub>2</sub>)</b>	POCh, Gliwice, Polska
<b>chlerek żelaza (II)</b>	POCh, Gliwice, Polska
<b>chlerek żelaza (III)</b>	POCh, Gliwice, Polska
<b>chloroform</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>coomasie brilliant blue R-250</b>	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
<b>cykliczny adenozympo-3',5'-monofosforan (cAMP)</b>	Sigma, Steinheim, Niemcy
<b>czynnik wzrostu nerwów (NGF)</b>	Promega, Madison, USA
<b>deoksyholan</b>	Roth, Karlsruhe, Niemcy
<b>deoksynukleotydy (dNTP)</b>	Promega, Madison, USA
<b>dimetylosulfotlenek (DMSO)</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>dioctan 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCFH-DA)</b>	Sigma, Saint Louis, USA
<b>ditiotreitol (DTT)</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>diwodorofosforan potasu (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Chempur, Piekary Śląskie, Polska
<b>DMEM medium</b>	IITD PAN, Wrocław, Polska
<b>dodecylosiarczan sodu (SDS)</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>etanol</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>ferrozyna</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>fluorek sodu (NaF)</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>fosforan 5-bromo-4-chloro-3-indolilu (BCIP)</b>	Roth, Karlsruhe, Niemcy
<b>genetycyna (G-418)</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>glicyna</b>	POCh, Gliwice, Polska
<b>glukoza</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>HEPES</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

<b>inhibitor fosfataz PhosSTOP</b>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy
<b>izopropanol</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>jodoacetamid</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>jonomycyna</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>kazeina</b>	BDH Chemicals, Hull, Wielka Brytania
<b>koktajl inhibitorów proteaz cOmplete</b>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy
<b>kwas mrówkowy</b>	Sigma, Steinheim, Niemcy
<b>kwas octowy</b>	POCh, Gliwice, Polska
<b>kwas siarkowy</b>	POCh, Gliwice, Polska
<b>kwas solny</b>	POCh, Gliwice, Polska
<b>kwas wersenowy (EDTA)</b>	Roth, Karlsruhe, Niemcy
<b>L-glutamina</b>	Biowest, Nuaille, France
<b>losowe startery (Random primers)</b>	Promega, Madison, USA
<b>marker Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa</b>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<b>medium DMEM</b>	IITD PAN, Wrocław, Polska
<b>medium DMEM/GlutaMAX</b>	Gibco, Waltham, USA
<b>medium Opti-MEM/Glutamax</b>	Gibco, Waltham, USA
<b>metanol</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>mieszanina deoksynukleotydów (dNTP)</b>	Promega, Madison, USA
<b>mleko odtłuszczone w proszku</b>	Mlekovita, Wysokie Mazowieckie, Polska
<b>N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (TEMED)</b>	Sigma, Saint Louis, USA
<b>nadsiarczan amonu (APS)</b>	Fluka, Bachs, Szwajcaria
<b>nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	Sigma, Saint Louis, USA
<b>octan urylu</b>	MicroShop, Piaseczno, Polska
<b>odwrotna transkryptaza (M-MLV Reverse Transcriptase, Rnase H Minus)</b>	Promega, Madison, USA
<b>penicylina+streptomycyna</b>	Sigma, Steinheim, Niemcy
<b>peptyd amyloidu β 1-42 (Aβ1-42)</b>	Tocris, Bristol, Wielka Brytania
<b>płatowa surowica bydłęca</b>	Biowest, Nuaille, France
<b>poli-L-lizyna</b>	Sigma, Steinheim, Niemcy
<b>rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowy (DPPH)</b>	Sigma, Saint Louis, USA
<b>roztwór błękitu trypanu</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>siarczan amonu</b>	POCh, Gliwice, Polska
<b>siarczan magnezu (MgSO<sub>4</sub>)</b>	POCh, Gliwice, Polska
<b>siarczan żelaza (II)</b>	POCh, Gliwice, Polska
<b>sól fizjologiczna buforowana Tris (TBS), 10x</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>suplement N<sub>2</sub></b>	Gibco, Waltham, USA
<b>surowica końska od dawcy</b>	Biowest, Nuaille, France
<b>surowicza albumina wołowa (FBS)</b>	Biowest, Nuaille, France
<b>szczurzy amyloid beta 1-42</b>	Tocris, Bristol, Wielka Brytania

<b>szczurzy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF)</b>	R&D Systems, Minneapolis, USA
<b>tioflawina T (ThT)</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>TRI Reagent</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>trietyloamina</b>	Chempur, Piekary Śląskie, Polska
<b>Tris-(hydroksymetylo)-aminometan (TRIS)</b>	Roth, Karlsruhe, Niemcy
<b>TRIS-HCl</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>Triton X-100</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>Trolox</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>trypsyna</b>	IITD PAN, Wrocław, Polska
<b>Tween 20</b>	Serva, Heidelberg, Niemcy
<b>tyreoglobulina</b>	IITD PAN, Wrocław, Polska
<b>węgiel aktywny</b>	Chempur, Piekary Śląskie, Polska
<b>węglan sodu</b>	POCH, Gliwice, Polska
<b>woda Mili-Q</b>	IITD PAN, Wrocław, Polska
<b>woda wolna od RNAz</b>	Promega, Madison, USA
<b>wodny roztwór amoniaku</b>	POCH, Gliwice, Polska
<b>wodorotlenek sodu</b>	POCH, Gliwice, Polska
<b>wodorowęglan amonu</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>wodorowęglan sodu</b>	POCH, Gliwice, Polska
<b>złóże Sephacryl 100-S HR</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<b>β-merkaptoetanol</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

## 6.2. Zestawy gotowe

### Zestaw do przygotowania żeli poliakrylamidowych

TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12% Bio-Rad, Hercules, USA

### Zestaw do oznaczania ilości białka

Pierce BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific, USA

### Zestaw ELISA do detekcji białka BDNF

BDNF Emax ImmunoAssay Systems Promega, Madison, USA

### Zestaw do reakcji real-time PCR

GoTaq® qPCR Master Mix Promega, Madison, USA

### Zestaw do degradacji genomowego DNA

DNase I Solution (1 unit/μL), RNase-free Thermo Scientific, USA

### 6.3. Przeciwciała

Tabela 6.1. Przeciwciała użyte w eksperymentach, wraz z ich rozcieńczeniem lub stężeniem.

Przeciwciało	Rozcieńczenie lub stężenie	Firma
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko cAMP	1:100	IITD PAN, Wrocław, Polska
Koniugat tyreoglobuliny i cAMP (TYR-cAMP)	0,5µg/ml	IITD PAN, Wrocław, Polska
Koniugat przeciwciał skierowanych przeciwko IgG królika z peroksydazą chrzanową	1:20000	Promega, Madison, USA
Koniugat przeciwciał skierowanych przeciwko łańcuchowi ciężkiemu IgG królika z fosfatazą alkaliczną	1:7500	Promega, Madison, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanym na Thr202 oraz Tyr204 białkom ERK1/2 (Cat. No. 4370)	1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko białkom ERK1/2 (Cat. No. 4695)	1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanemu na Ser133 białku CREB (Cat. No. 9198)	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko białku CREB (Cat. No. 9197)	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko Synapsynie I (Cat. No. 5297)	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko β-aktynie (Cat. No. 4970)	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanemu na Ser473 białku AKT (Cat. No. 4060)	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko białku AKT (Cat. No. 4691)	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko białku PKA C-α (Cat. No. 4782)	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanemu na Thr197 białku PKA C (Cat. No. 4781)	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko białku NeuN (Cat. No. ab177487)	1:3750	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko białku MAP-2 (Cat. No. 8707)	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko białku BDNF (Cat. No. A10760)	1:1000	ABclonal, Woburn, USA

## 6.4. Sekwencje oligonukleotydów

Tabela 6.2. Startery użyte w eksperymentach wraz z ich sekwencją i temperaturą topnienia (T<sub>m</sub>).

Gen	Sekwencja	T <sub>m</sub> [°C]
<i>Gapdh</i>	F: 5'-AACAGCAACTCCCATTCTTC-3'	56.4
	R: 5'- TGGTCCAGGGTTTCTTACTC-3'	58.4
<i>Mn-SOD</i>	F: 5'-GGAAGCCATCAAACGTGACT-3'	67.2
	R: 5'-CCTTGCACTGGATCCTGATT-3'	63.9
<i>Cu/Zn-SOD</i>	F: 5'AGGGCATCATCAATTTTCGAGC-3'	64.0
	R: 5'ACATTGCCCAAGTCTCCAAC-3'	64.0

## 6.5. Aparatura i akcesoria

<b>Aparat do chromatografii ciekowej Easy-nLC 1000</b>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<b>Aparat do transferu EBX-700</b>	C.B.S. Scientific, San Diego, USA
<b>Czytnik płytek CLARIOstar Plus</b>	BMG LABTECH, Ortenberg, Niemcy
<b>Czytnik płytek Dynatech MR 5000</b>	Dynatech Laboratories, Chantilly, USA
<b>Czytnik płytek EnSPire 2300</b>	PerkinElmer, Waltham, USA
<b>Czytnik płytek Synergy H4 Hybrid Reader</b>	BioTek, Winooski, USA
<b>Inkubator do hodowli komórkowych (33°C) HF90</b>	Heal Force, Szanghaj, Chiny
<b>Inkubator do hodowli komórkowych (37°C) C150</b>	Binder, Tuttlingen, Niemcy
<b>Komora laminarna NU440-400E</b>	NuAire, Plymouth, USA
<b>Łaźnia wodna WB-4MS Biosan</b>	Biogenet, Józefów, Polska
<b>Mikroskop świetlny odwrócony Leica DM IRE2</b>	Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy
<b>Mikroskop świetlny odwrócony Leica DMIL LEDFL</b>	Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy
<b>Mini-PROTEAN Tetra Cell do SDS-PAGE</b>	BioRad, Hercules, USA
<b>Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System</b>	BioRad, Hercules, USA
<b>Nanofotometr (NanoPhotometer P360)</b>	IMPLEN, Monachium, Niemcy
<b>pH-metr model 420A Orion</b>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<b>Platforma Prometheus NT.48</b>	NanoTemper Technologies GmbH, Monachium, Niemcy
<b>Sonikator Branson 3800</b>	EMERSON, St. Louis, USA
<b>Spektrofotometr UviLine 9400</b>	SI Analytics GmbH, Mainz, Niemcy
<b>Spektrometr mas LTQ Orbitrap Elite ETD</b>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<b>Termocykler BioRad Thermal Cycler T100</b>	BioRad, Hercules, USA
<b>Termocykler CFX Connect Real-Time PCR System</b>	BioRad, Hercules, USA
<b>Blok grzejno-chłodzący z wytrząsaniem (TermoMixer compact)</b>	Eppendorf, Hamburg, Niemcy
<b>Transmisyjny mikroskop elektronowy JEOL 1200</b>	JEOL, Tokio, Japonia

<b>Wirówka model 1K15</b>	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Niemcy
<b>Wirówka model 5804R</b>	Eppendorf, Hamburg, Niemcy

## 6.6. Linie komórkowe

- Linia komórkowa PC12-Tet-On - komórki szczurzego guza chromochłonnego nadnerczy (Clontech, Heidelberg, Niemcy)

Ze względu na ich neuroektodermalne pochodzenie oraz zdolność do fenotypowego różnicowania się w kierunku komórek podobnych do neuronów współczulnych w odpowiedzi na NGF jest to linia rutynowo stosowana do badania molekularnych mechanizmów neuroprotekcji, neurosekrecji, synaptogenezy oraz neurotoksyczności. Komórki PC12 nie posiadają receptora TrkB [239], [240].

- Linia komórkowa H19-7 – unieśmiertelnione komórki prekursorowe hipokampa szczura (ATCC, Manassas, USA)

Linie komórkową H19-7 wyprowadzono z hipokampa 17-dniowych zarodków szczura Holtzman, i unieśmiertelniono przez transdukcję termowrażliwego antygeny T mutantu wirusa tsA58 SV40. W obecności czynnika bFGF komórki H19-7 różnicują się do fenotypu neuronalnego w temperaturze 37-39°C. Komórki H19-7 posiadają receptor TrkB [239].

Obie linie komórkowe otrzymano z Laboratorium Białek Sygnałowych IITD PAN we Wrocławiu dzięki uprzejmości dr hab. Janusza Matuszyka.

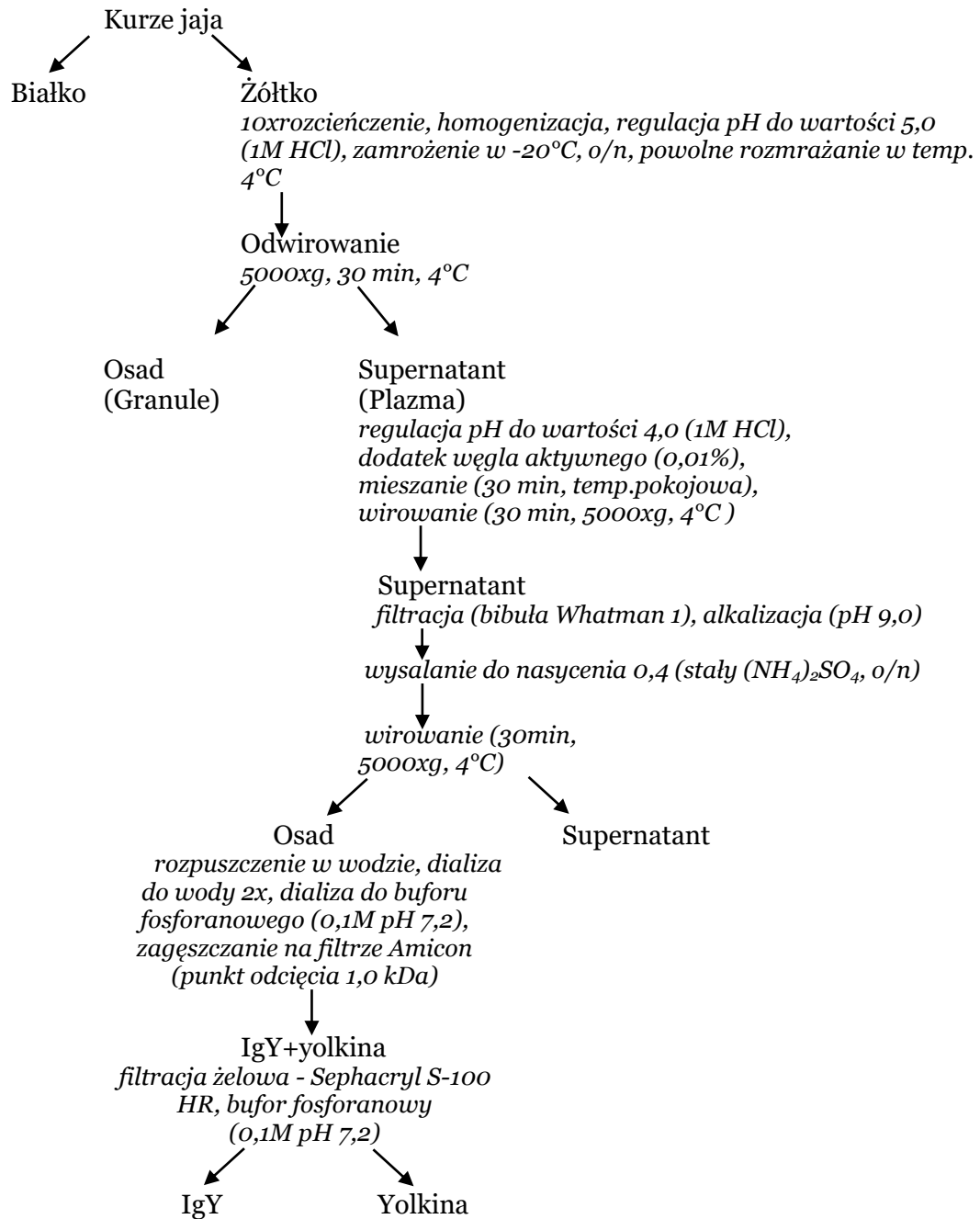
## 6.7. Programy komputerowe

<b>MS Office</b>	Microsoft, Redmond, USA
<b>GraphPad Prism 9.1.0</b>	GraphPad Software, San Diego, USA
<b>Image Lab Software</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>PR.Therm Control</b>	NanoTemper Technologies GmbH, Monachium, Niemcy
<b>PR.Stability Analysis</b>	NanoTemper Technologies GmbH, Monachium, Niemcy
<b>ProteinScape 3.0</b>	Bruker, Billerica, USA
<b>Bio-Rad CFW Maestro</b>	Bio-Rad, Hercules, USA

## 6.8. Izolacja i oczyszczanie kompleksu peptydowego yolkina z żółtek jaj kurzych

Izolację i oczyszczanie yolkiny wykonano zgodnie z procedurą opracowaną przez Polanowskiego i wsp. [220]. Schemat izolacji yolkiny przedstawiono na Rysunku 6.1.





**Rys. 6.1. Schemat izolacji yolkiny z jaj kurzych.**

Z jaj oddzielono żółtka, które następnie homogenizowano i rozcieńczono dziewięcioma objętościami zimnej (4°C) wody destylowanej, następnie pH zawiesiny doprowadzono do wartości 5,0 (1M HCl) i pozostawiono w temperaturze -20°C przez 24 godziny. Po powolnym rozmrożeniu zawiesinę odwirowano (5000xg, 30 min, temp. 4°C), i do otrzymanego supernatantu dodano 0,01% węgiel aktywny, następnie pH doprowadzono do wartości 4,0 (1M HCl), mieszaninę przez 30 min mieszano bardzo powoli i ponownie odwirowano (5000xg, 30 min, temp. 4°C). Supernatant przefiltrowano przez bibułę Whatman, pH przesączu doprowadzono do wartości 9,0 (1M NaOH). Białka wysalano stałym siarczanem amonu do poziomu nasycenia równego 0,4 (12 godzin, temp. 4°C). Po tym czasie mieszaninę wirowano (5000xg, 30 min, temp. 4°C). Osad rozpuszczano w niewielkiej objętości wody, następnie dializowano dwukrotnie do wody

(24 godziny, temp. 4°C) i kolejno do buforu fosforanowego (0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2) przez 24 godziny w temperaturze 4 °C.

Tak otrzymany preparat IgY+yolkina zagęszczano na membranie z regenerowanej celulozy Amicon (punkt odcięcia 1,0 kDa). Koncentrat poddano sączeniu molekularnemu na złożu Sephacryl S-100 HR (kolumna 2,5 cm x 70 cm), zrównoważonym 0,1 M buforem fosforanowym (pH 7,2). Rozdział prowadzono przy przepływie 0,5 ml/min. Frakcje eluowane między 260, a 400 minutą rozdziału zawierały yolkinę. Frakcje zawierające yolkinę połączono, a następnie poddano dializie do wody. Odsolony preparat zliofilizowano.

## **6.9.Ocena czystości i stabilności preparatu yolkina**

1 mg liofilizatu yolkiny rozpuszczono w 1 ml sterylnego PBS. W tak przygotowanej próbce oznaczono stężenie białka metodą BCA. Czystość preparatu yolkiny oznaczono za pomocą rozdziału elektroforetycznego w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Ponadto oznaczono stopień zanieczyszczenia endotoksynami bakteryjnymi.

### **6.9.1. Oznaczanie białka metodą BCA**

Stężenie białka w badanej próbce oznaczono metodą BCA przy użyciu Pierce™ BCA Protein Assay Kit. W tym celu na dołki płytki 96-dołkowej naniesiono 1 µl badanej próby, 9 µl wody miliQ oraz 200 µl odczynnika BCA (kwas bicynchoninowy: 4% siarczan miedzi w stosunku v/v 4:1). Płytkę inkubowano 30 minut w 37°C, następnie odczytano absorbancję przy λ=562 nm za pomocą czytnika płytek EnSPire 2300 (PerkinElmer). Stężenie białka wyznaczono w oparciu o krzywą kalibracyjną, do przygotowania której użyto wzorcowe roztwory BSA o stężeniu od 62,5 do 1000 µg/ml.

### **6.9.2. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)**

Czystość preparatu yolkina oznaczono za pomocą rozdziału elektroforetycznego w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Żel poliakrylamidowy (żel zagęszczający 4% oraz żel rozdzielający 12%) przygotowano wykorzystując gotowy zestaw do wylewania żeli TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12%, (Bio-Rad) zgodnie z zaleceniami producenta. Do badanej próbki dodano bufor obciążający Laemmli (4x) oraz β-merkaptotanol (stężenie końcowe 5%), a następnie denaturowano przez 5 minut w 99°C. Do studzienek żelu nanoszono próbki yolkiny (20 µg) oraz białkowy standard masy (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo-Scientific). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w warunkach denaturujących z użyciem buforu do elektroforezy (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glicyna, 0,1% SDS), w aparacie do elektroforezy Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad), przy napięciu 80 V (15 minut) dla żelu zagęszczającego, następnie 200 V (30 minut) dla żelu rozdzielającego. Po zakończonym rozdziale, żel inkubowano z barwnikiem Coomassie Brilliant blue R-250 przez 1 godzinę, w celu wizualizacji peptydów. Po tym czasie żel odbarwiano w roztworze woda:metanol:kwas octowy (50:40:10, v:v:v) przez 1 godzinę, zmieniając go co 20 minut. Zdjęcie żelu wykonano w aparacie Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-Rad).

### **6.9.3. Oznaczanie czystości mikrobiologicznej preparatu yolkina**

Czystość mikrobiologiczna preparatu yolkina została oznaczona przy pomocy komercyjnie dostępnego zestawu Endozyme (bioMerieux; Marcy-l'Étoile, France) dzięki uprzejmości Dr Pauliny Miernikiewicz z Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów w IITD PAN.

### **6.10. Ocena stabilności przechowalniczej yolkiny**

W celu zbadania stabilności przechowalniczej yolkiny, preparat (liofilizat) rozpuszczono w sterylnym PBS (1 mg/ml) i przechowywano przez okres dwóch tygodni w temperaturze chłodniczej 4°C i zamrażalniczej -20°C. Dodatkowo, yolkinę przechowywano w warunkach zamrażalniczych przez okres 18 miesięcy. Kontrolę odnośnikową stanowił liofilizat yolkiny rozpuszczony w PBS bezpośrednio przed wykonaniem analizy. Rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących prowadzono zgodnie z opisem zawartym w punkcie 6.9.2. Profil peptydowy uzyskany dla poszczególnych preparatów poddano analizie jakościowej.

### **6.11. Ocena stabilności termicznej yolkiny**

Analizę stabilności termicznej preparatów yolkiny, uzyskanych z czterech kolejnych izolacji, przeprowadzono z wykorzystaniem platformy Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies GmbH). Właściwości fluorescencyjne reszt tryptofanu i tyrozyny w białku silnie zależą od jego bliskiego otoczenia. Śledząc zmiany w ich fluorescencji, można ocenić stabilność termiczną białka, bez stosowania znaczników fluorescencyjnych. Pomiaru stabilności yolkiny dokonano w kapilarach, do których wprowadzono 10 µl roztworu yolkiny w PBS (1 mg/ml). W celu określenia optymalnej mocy wzbudzenia LED, początkowy pomiar fluorescencji przeprowadzono w temperaturze 20°C przy długości fali 330nm/350nm. Proces rozfałdowania termicznego białka badano stosując liniowy wzrost temperatury 1°C/min w zakresie od 20°C do 90°C. Stabilność termiczną preparatów yolkiny określono poprzez wyznaczenie temperatury topnienia, w której 50% białka uległo rozfałdowaniu. Analizę danych przeprowadzono przy użyciu programów PR.Therm Control i PR.Stability Analysis (NanoTemper Technologies GmbH).

Badania wykonano we współpracy z Panem Pawłem Kanią (NanoTemper).

### **6.12. Identyfikacja yolkiny metodą spektrometrii mas (MS)**

#### **6.12.1. Przygotowanie próbek**

Kompleks peptydowy yolkina rozdzielono za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących zgodnie z opisem w punkcie 6.9.2. Następnie z żelu wycięto pożądane prążki i pocięto je na fragmenty o wymiarze ok. 1 x 1 mm, które poddano odbarwianiu z nadmiaru barwnika Coomassie z wykorzystaniem mieszaniny 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>:acetonitryl (1:1, v:v). Następnie fragmenty żelu odwodniono przez ich dwukrotną inkubację w acetonitrylu, krótkie zwirowanie fragmentów żelu (short spin) i usunięcie płynu. Redukcję mostków dwusiarczkowych utworzonych przez łańcuchy boczne cystein przeprowadzono poprzez dodanie 10 mM roztworu ditiotretolu w 100 nM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> i inkubację przez 30 minut w 56°C. Następnie fragmenty żelu ponownie odwodniono przez ich dwukrotną inkubację w acetonitrylu, krótkie zwirowanie fragmentów żelu (short spin) i usunięcie płynu. Alkilację grup sulfhydrylowych cystein przeprowadzono przez dodanie do fragmentów żelu 55 mM roztworu jodoacetamidu w 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> i inkubację przez 20 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Trawienie preparatu w żelu przeprowadzono roztworem trypsyny o stężeniu 13 ng/µl w 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> z dodatkiem 10% acetonitrylu

w temperaturze 37°C przez noc. Po nocnej inkubacji próbki krótko zwirowano (short spin) i zebrano supernatanty. W celu ekstrakcji peptydów fragmenty żelu poddano dodatkowej ekstrakcji 70% acetonitrylem w temperaturze pokojowej, po czym próbki krótko odwirowano (short spin), a uzyskane supernatanty połączono. Do przygotowania roztworów roboczych użyto odczynników o klasie czystości LC-MS i wody MiliQ.

### **6.12.2. Chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas (LC-MS)**

Rozdział próbek przeprowadzono za pomocą chromatografii cieczowej w aparacie Easy nLC 1000 (Thermo Scientific) oraz poddano analizie MS w aparacie LTQ Orbitrap Elite ETD (Thermo Scientific). Do rozdziału wykorzystano następujące odczynniki i parametry: prekolumna nano Acclaim PepMap 100 C18 (Thermo Scientific); kolumna Acclaim PepMap, 75  $\mu\text{m}$   $\times$  50 cm (Thermo Scientific); eluent A: woda, 0,1% kwas mrówkowy (SIGMA); eluent B: acetonitryl:woda (90:10), 0,1% kwas mrówkowy (SIGMA); gradient: 5-55% eluentu B, czas: 150 minut; przepływ eluentu: 300 nl/min, nastrzyk 15  $\mu\text{l}$ . Do przygotowania eluentów użyto rozpuszczalników o klasie czystości LC-MS i wody MiliQ. Widma mas zbierano w trybie jonów dodatnich (110-2000 m/z). Analizę danych oraz identyfikację przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania ProteinScape 3.0 (Bruker) z silnikiem wyszukiwania MASCOT (Matrix Science, 2.5.0) w bazie SwissProt (kryteria wyszukiwania: taksonomia: vertebrates; tolerancja masy: 10 ppm; modyfikacje stałe: karbamidometylacja (C); modyfikacje zmienne: oksydacja (M), acetylacja (N-koniec).

Badania wykonano we współpracy z Dr Katarzyną Kapczyńską z Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej w IITD PAN we Wrocławiu.

### **6.13. Hodowle komórkowe**

Linie komórkową PC12-Tet-On (nazywaną dalej PC12) hodowano w medium DMEM/GlutaMAX wzbogaconym w 4,5 g glukozy, 10% płodową surowicę bydlęcą, 5% surowicę końską oraz antybiotyki (100 U/ml penicyliny oraz 0,1 mg/ml streptomycyny). Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Komórki pasażowano 1-2 razy w tygodniu. Proces różnicowania komórek PC12 w kierunku fenotypu neuronalnego przeprowadzono w medium DMEM/GlutaMAX wzbogaconym w 1% FBS oraz NGF (100 ng/ml) w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO<sub>2</sub>.

Komórki linii H19-7 hodowano w medium DMEM/GlutaMAX wzbogaconym w 4,5 g glukozy, z dodatkiem 10% FBS, L-glutaminy oraz antybiotyków: genetycyny (G418, 500 $\mu\text{g}$ /ml), penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (0,1 mg/ml). Hodowlę prowadzono w temperaturze 33°C i atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Komórki pasażowano 1-2 razy w tygodniu. Proces różnicowania komórek H19-7 w kierunku dojrzałych neuronów przeprowadzono w medium DMEM/GlutaMAX wzbogaconym w zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) (10 ng/ml) oraz suplement N2 (1%) w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO<sub>2</sub>.

### **6.14. Przygotowanie amyloidu beta 1-42 (A $\beta$ 1-42)**

#### **6.14.1. Monomeryzacja A $\beta$ 1-42**

Szczurzy A $\beta$ 1-42 (Tocris) rozpuszczono w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropanolu (HFIP) i mieszano na wytrząsarce worteks przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór poddano sonikacji przez 15 minut w łaźni lodowej, po czym pozostawiono w temperaturze pokojowej w celu odparowania rozpuszczalnika. Otrzymany liofilizat rozpuszczono w 0,1%

wodnym roztworze amoniaku (końcowe stężenie A $\beta$ 1-42 wynosiło 250  $\mu$ M) i poddano działaniu ultradźwięków przez 5 min w łaźni lodowej. Próbę rozporcjowano i przechowywano w -80°C.

#### **6.14.2. Agregacja A $\beta$ 1-42**

W celu uzyskania oligomerów A $\beta$ 1-42, amyloid przygotowany zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 6.14.1. rozpuszczono w sterylnym PBS do końcowego stężenia 250  $\mu$ M, po czym próbkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Tak przygotowany preparat wykorzystano do dalszych badań.

#### **6.15. Ocena przeżywalności komórek testem MTT**

Wpływ yolkiny na przeżywalność komórek PC12 oraz H19-7 oznaczano testem MTT [241]. Test MTT jest testem kolorymetrycznym i jest oparty na zdolności enzymu dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcenia rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowy) o zabarwieniu żółtym do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu o zabarwieniu fioletowym. Kryształy formazanu są rozpuszczalne w DMSO dając barwny roztwór, którego intensywność mierzona jest przy długości fali 570 nm. Ilość barwnego zredukowanego MTT jest proporcjonalna do średniej aktywności metabolicznej populacji komórek, co przekłada się na liczbę żywych komórek w badanej próbce.

a) komórki PC12 (1x10<sup>4</sup> komórek/100  $\mu$ l pełnego medium) wysiewano do dołków płytki 96-dołkowej opłaszczonej poli-L-lizyną i inkubowano 24 godziny w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Następnego dnia komórki stymulowano yolkiną (10, 100 i 150  $\mu$ g/ml) i inkubowano przez 24 godziny w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane.

b) komórki PC12 (1x10<sup>4</sup> komórek/100  $\mu$ l pełnego medium) wysiewano do dołków płytki 96-dołkowej opłaszczonej poli-L-lizyną i inkubowano 24 godziny w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Następnego dnia komórki stymulowano yolkiną (100 lub 150  $\mu$ g/ml) w obecności lub nieobecności A $\beta$ 42 (20  $\mu$ M), przygotowanego zgodnie z punktem 6.14.2, i inkubowano przez 24 godziny w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane. Próbę odnośnikową stanowiły komórki inkubowane z samym A $\beta$ 1-42.

c) komórki H19-7 (1x10<sup>4</sup> komórek/100  $\mu$ l pełnego medium) wysiewano do dołków płytki 96-dołkowej i inkubowano 24 godziny w 33°C, 5% CO<sub>2</sub>. Następnego dnia komórki stymulowano yolkiną (10 lub 100  $\mu$ g/ml) przez 24 godziny i inkubowano w 33°C, 5% CO<sub>2</sub>. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane.

Po upływie czasu inkubacji medium na płytkach wymieniono na świeże medium z MTT (5 mg/ml) i inkubowano przez kolejne 4 godziny. Następnie usunięto medium, a komórki rozpuszczono dodając sterylny DMSO (100  $\mu$ l/dołek). Po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej zmierzono absorbancję przy długości 570 nm przy użyciu czytnika płytek EnSPire 2300 (PerkinElmer). Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane.

#### **6.16. Ocena zmian w morfologii komórek techniką mikroskopii świetlnej**

##### **A. Komórki PC12**

- wysiewano do dołków płytki 12-dołkowej, w gęstości 1x10<sup>5</sup> komórek/dołek/500  $\mu$ l pełnego medium. Następnego dnia medium hodowlane wymieniono na medium różnicujące zawierające 1% FBS oraz NGF (100 ng/ml) lub 1% FBS oraz yolkinę (100  $\mu$ g/ml). Komórki różnicowano w kierunku neuronów przez okres 7 dni obserwując tworzenie wypustek nerwowych. Zmiany w morfologii komórek obserwowano w mikroskopie świetlnym (Leica DM IRE2) z kontrastem fazowym.

Sporządzono dokumentację fotograficzną. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane (NS).

- wysiewano do dołków szkiełka ośmiokomorowego typu chamber slide (Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™; Thermo Scientific) opłaszczonych poli-L-lizyną, w gęstości  $1 \times 10^4$  komórek/dołek/300  $\mu$ l pełnego medium. Następnego dnia medium hodowlane wymieniono na medium różnicujące zawierające 1% FBS oraz NGF (100 ng/ml). Komórki różnicowano w kierunku neuronów przez okres 5 dni obserwując tworzenie wypustek nerwowych. Zróżnicowane komórki PC12 inkubowano następnie z agregowanym A $\beta$ 1-42 (20  $\mu$ M) przygotowanym zgodnie z punktem 6.14.2, w obecności lub nieobecności yolkiny (150  $\mu$ g/ml), przez 23 godziny w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Zmiany w morfologii komórek obserwowano w mikroskopie świetlnym (Leica DM IRE2) z kontrastem fazowym. Sporządzono dokumentację fotograficzną.

#### B. Komórki H19-7

- wysiewano do dołków płytki 12-dołkowej, w gęstości  $1 \times 10^5$  komórek/dołek/500  $\mu$ l pełnego medium i inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 33°C. Następnego dnia medium hodowlane wymieniono na medium różnicujące DMEM/GlutaMAX zawierające suplement N2. Komórki inkubowano z yolkiną (100  $\mu$ g/ml) przez 48 godzin w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane bFGF (10 ng/ml). Zmiany w morfologii komórek obserwowano w mikroskopie świetlnym (Leica DM IRE2) z kontrastem fazowym. Sporządzono dokumentację fotograficzną.

### 6.17. Analiza poziomu ekspresji genów

#### 6.17.1. Stymulacja komórek

Zawiesinę komórek PC12 ( $1 \times 10^6$  komórek/ml/dołek) wysiewano do dołków 6-dołkowej płytki w medium Opti-MEM ze zredukowanym stężeniem surowicy. Następnego dnia komórki potraktowano yolkiną (100  $\mu$ g/ml) i inkubowano w 37°C przy 5% nasyceniu CO<sub>2</sub>. W celu zbadania ekspresji genów kodujących białka systemu antyoksydacyjnego (*Mn-SOD*, *Cu/Zn-SOD*) komórki PC12 stymulowano: yolkiną (100  $\mu$ g/ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (75  $\mu$ M) oraz yolkiną (100  $\mu$ g/ml) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (75  $\mu$ M) podanymi jednocześnie i inkubowanymi z komórkami przez 60 minut. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane.

#### 6.17.2. Izolacja RNA

Całkowite RNA izolowano z komórek w warunkach sterylnych stosując zmodyfikowaną metodę Chomczyńskiego i Sacchi [242] z wykorzystaniem odczynnika TRI Reagent (Merck).

Po upływie czasu stymulacji, komórki wraz z medium zebrano do probówek wirówkowych typu Eppendorf 1,5 ml i odwirowano przy 300xg przez 5 minut. Supernatant odrzucono, a osad komórek zawieszono w 1 ml odczynnika TRI Reagent. Następnie dodano 200  $\mu$ l chloroformu, wytrząsano przez chwilę i pozostawiono na minimum 7 minut w temperaturze pokojowej. Próbki następnie wirowano przez 15 min przy 12 000xg w 4°C. Po rozdzieleniu faz, do sterylnych probówek wirówkowych typu Eppendorf odebrano górną fazę wodną (ok. 400  $\mu$ l) zawierającą całkowite RNA. W celu strącenia RNA, w kolejnym kroku dodano alkohol izopropylowy (400  $\mu$ l). Próbkę wytrząsano, następnie inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej i odwirowano (12 000xg, 10 min, 4°C). W kolejnym kroku supernatant odrzucono, a osad przemyto 500  $\mu$ l 75% etanolu i ponownie odwirowano (7500xg, 5 min, 4°C). Supernatant odrzucono, a uzyskany osad suszono na powietrzu i następnie zawieszono w wodzie wolnej od RNAz, w objętości 30  $\mu$ l. Dla

zwiększenia wydajności procesu, RNA inkubowano następnie przez 10 minut w 55°C w bloku grzejno-chłodzącym z wytrząsaniem (ThermoMixer, Eppendorf). Stężenie wyizolowanego RNA oznaczono spektrofotometrycznie, z użyciem czytnika NanoPhotometer® P360 (Implen). Czystość preparatu oceniono na podstawie stosunku absorbancji zmierzonych przy długości fali  $\lambda=260$  nm i  $\lambda=280$  nm. Dla uzyskanych roztworów RNA wartość stosunku dwóch absorbancji A260/A280 mieściła się w zakresie 1,9-2,0, co świadczy o dużej czystości preparatu. Wyizolowane RNA przechowywano w temperaturze -80°C.

### 6.17.3. Degradacja genomowego DNA

W celu pozbycia się genomowego DNA z wyizolowanego materiału, 1  $\mu$ g RNA poddano trawieniu deoksyrybonukleazą I korzystając z zestawu do degradacji genomowego DNA (DNase I Solution, RNase-free, Thermo Fisher) zgodnie z zaleceniami producenta. Objętość mieszaniny reakcyjnej zawierającej 1  $\mu$ g RNA, 1  $\mu$ l buforu z MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l (1 U) DNAzy I uzupełniono wodą wolną od RNAz do objętości 10  $\mu$ l i inkubowano przez 30 minut w 37°C. Reakcję przerwano poprzez dodanie 50 mM EDTA (1  $\mu$ l) i inkubację mieszaniny przez 10 minut w 65°C.

### 6.17.4. Odwrotna transkrypcja na matrycy RNA

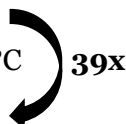
Materiał RNA (1  $\mu$ g), pozbawiony genomowego DNA, wykorzystano do reakcji odwrotnej transkrypcji. W tym celu dodano do niego 0,5  $\mu$ g (1  $\mu$ l) losowych starterów (Random primers, Promega) oraz 5,7  $\mu$ l wody wolnej od RNAz i inkubowano w temperaturze 70°C przez 5 minut. Następnie do próbek dodano 5  $\mu$ l buforu dla odwrotnej transkryptazy (M-MLV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer, Promega), 1,3  $\mu$ l 10 mM mieszaniny deoksynukleotydów (dNTP, Promega) oraz 200U odwrotnej transkryptazy (M-MLV Reverse Transcriptase, Promega). Objętość końcowa próbek wynosiła 25  $\mu$ l. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w termocyklerze (Thermal Cycler T100, BioRad) w cyklu: 40 minut w 37°C, 40 minut w 42°C, 10 minut w 70°C. Po zakończeniu reakcji, cDNA rozcieńczono wodą wolną do RNAz do objętości 125  $\mu$ l i przechowywano w temperaturze -20°C.

### 6.17.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR)

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono w termocyklerze gradientowym (CFX Connect Real-Time PCR Detection System; Bio-Rad) z wykorzystaniem zestawu do reakcji real-time PCR GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). Mieszanina reakcyjna zawierała 5  $\mu$ l buforu MasterMix (barwnik fluorescencyjny GreenSYBR, polimeraza GoTaq Hot Start, MgCl<sub>2</sub>, dNTP), 2,5  $\mu$ l matrycy cDNA oraz 1,25  $\mu$ l swoistego startera przedniego (4  $\mu$ M) i 1,25  $\mu$ l swoistego startera wstecznego (4  $\mu$ M) (sekwencje starterów podano w Tabeli 6.2). Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25  $\mu$ l. Kontrolę negatywną dla każdej reakcji PCR stanowiła mieszanina reakcyjna z matrycą RNA, która nie była poddana odwrotnej transkrypcji (NRT) oraz mieszanina reakcyjna zawierająca wszystkie składniki oprócz właściwej matrycy RNA (NTC).

#### Kolejne etapy reakcji PCR (1 cykl):

- aktywacja polimerazy – 10 minut w 95°C
  - denaturacja matrycy – 15 sekund w 95°C
  - przyłączenie starterów – 30 sekund w 60°C
  - elongacja – 15 sekund w 72°C
- Reakcje prowadzono w ilości 40 cykli.



Analizę ekspresji badanych genów prowadzono z zastosowaniem metody 2-( $\Delta\Delta$ CT) względem genu referencyjnego – dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*GAPDH*) (gen o konstytutywnej ekspresji). Gen referencyjny został wybrany na podstawie danych literaturowych, a warunki prowadzenia reakcji zostały zoptymalizowane. Kontrolę specyficzności stosowanych starterów oceniano na podstawie krzywych topnienia produktów. Uzyskane wyniki analizowano z użyciem programu Bio-Rad CFW Maestro.

## 6.18. Western Blotting

### 6.18.1. Stymulacja komórek PC12

Zawiesinę komórek PC12 ( $1 \times 10^6$  komórek/ml/dolek) wysiano do dołeków płytki 6-dolekowej, opłaszczonej poli-L-lizyną, w medium ze zredukowanym stężeniem surowicy (Opti/MEM lub DMEM z 2% FBS). Następnego dnia komórki potraktowano yolkiną (100  $\mu$ g/ml) lub NGF (100 ng/ml) – kontrola pozytywna i inkubowano odpowiedni czas w 37°C przy 5% nasyceniu CO<sub>2</sub> (Tabela 6.3). Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane.

Tabela 6.3. Czasy stymulacji komórek yolkiną (100  $\mu$ g/ml) lub NGF (100 ng/ml) w zależności od badanego białka w komórkach PC12.

Badane białko	Stymulacja yolkiną		Stymulacja NGF
	Stymulacja krótkotrwała [min]	Stymulacja długotrwała [godz.]	
<b>p-ERK1/2</b>	15, 30, 45, 60, 90	2, 6, 12, 24	90 min
<b>ERK1/2</b>	15, 30, 45, 60, 90	2, 6, 12, 24	90 min
<b>p-CREB</b>	15, 30, 60, 90	2, 6, 12, 24	90 min
<b>CREB</b>	15, 30, 60, 90	2, 6, 12, 24	90 min
<b>p-AKT</b>	15, 30, 45, 60, 90	2, 6, 12, 24	90 min
<b>AKT</b>	15, 30, 45, 60, 90	2, 6, 12, 24	90 min
<b>p-PKA C-<math>\alpha</math></b>	15, 30, 60, 90, 120		120 min
<b>PKA C</b>	15, 30, 60, 90, 120		120 min
<b>BDNF</b>		1, 3, 6	
<b>Synapsyna I</b>		24, 48, 72	
<b>NeuN</b>		24, 48, 72	
<b>MAP-2</b>		24, 48, 72	

### 6.18.2. Stymulacja komórek H19-7

Zawiesinę komórek H19-7 ( $1 \times 10^6$  komórek/ml/dolek) wysiano do dołeków płytki 6-dolekowej opłaszczonej poli-L-lizyną, w pełnym medium hodowlanym. Następnego dnia medium zmieniono na medium ze zredukowanym stężeniem surowicy (2% FBS) i stymulowano komórki yolkiną (100  $\mu$ g/ml) przez określony czas w 33°C przy 5% nasyceniu CO<sub>2</sub> (Tabela 6.4). Badając wpływ yolkiny na zmiany w ekspresji białek NeuN, MAP2, Synapsyny I komórki zawieszono w medium różnicującym DMEM/GlutaMAX wzbogaconym w suplement N2 (1%) i stymulowano yolkiną (100  $\mu$ g/ml) przez określony czas w 37°C przy 5% nasyceniu CO<sub>2</sub> (Tabela 6.4). Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane.



**Tabela 6.4. Czasy stymulacji komórek yolkiną (100 µg/ml) w zależności od badanego białka w komórkach H19-7.**

Badane białko	Stymulacja yolkiną	
	Stymulacja krótkotrwała [min]	Stymulacja długotrwała [godz.]
<b>p-ERK1/2</b>	15, 30, 60, 90	2, 6, 24
<b>ERK1/2</b>	15, 30, 60, 90	2, 6, 24
<b>p-CREB</b>	15, 30, 60, 90	2, 6, 24
<b>CREB</b>	15, 30, 60, 90	2, 6, 24
<b>p-AKT</b>	15, 30, 60, 90	2, 6, 24
<b>AKT</b>	15, 30, 60, 90	2, 6, 24
<b>NeuN</b>		24, 48
<b>MAP-2</b>		24, 48
<b>Synapsyna I</b>		24, 48

### **6.18.3. Przygotowanie lizatów komórkowych**

Lizę komórek przeprowadzano na płytce 6-dołkowej, po odpipetowaniu medium z dołka, dodano 70 µl buforu do lizy RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,5% deoksycholany) z dodatkiem NaF (10mM) oraz mieszaniny inhibitorów proteaz (cOmplete EDTA-free Roche, 100x) oraz fosfataz (100x) (Roche). Lizaty inkubowano 30 minut w lodzie, następnie wirowano 10 minut w 4°C przy 12 000xg. W próbkach oznaczono stężenie białka metodą BCA według procedury opisanej w rozdziale Materiały i metody, punkt 6.9.1. Próbkę przechowywano w -20°C.

### **6.18.4. SDS-PAGE**

Białka lizatów komórkowych rozdzielano w żelu poliakrylamidowym zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i metody, punkt 6.9.2. Do studzienek żelu nanoszono lizaty komórkowe zawierające od 30 do 50µg białka (w zależności od rodzaju badanego białka). Po zakończonym rozdziale przeprowadzono elektrotransfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową.

### **6.18.5. Elektrotransfer białek**

Po rozdziale elektroforetycznym białka przenoszono na membranę nitrocelulozową (0,45 µm). Elektrotransfer białek prowadzono przez 1,5 godziny w aparacie EBX-700 (C. B. S. Scientific) przy natężeniu 200 mA w buforze do transferu zawierającym 25 mM Tris-HCl pH, 192 mM glicynę (pH 8.3) oraz 20% metanol, na lodzie.

### **6.18.6. Immunodetekcja białek**

Po transferze membranę nitrocelulozową z immobilizowanymi białkami inkubowano przez 1 godzinę w 5% odtłuszczonym mleku w buforze TBST (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20) w temperaturze pokojowej, w celu zablokowania miejsc oddziaływań nieswoistych. Po tym czasie membranę płukano trzykrotnie buforem TBST, a następnie inkubowano przez noc w 4°C z przeciwciałem pierwszorzędowym skierowanym przeciwko badanemu białku, rozpuszczonym wcześniej w 5% BSA w TBST (rozcieńczenia przeciwciał pierwszorzędowych podano w Tabeli 6.1). Następnie membranę płukano trzykrotnie buforem

TBST aby pozbyć się niezwiązanych przeciwciał. W kolejnym etapie membranę inkubowano z roztworem przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z alkaliczną fosfatazą (1:7500) w 5% mleku w TBST przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Membrany ponownie płukano (3x10 min w TBST), a następnie inkubowano z mieszaniną barwnych substratów dla fosfatazy alkalicznej (v/v, 9:7) - NBT (76mg/ml w 70% DMF) oraz BCIP (50mg/ml w DMF), w buforze TBS-Mg (100 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 100 mM Tris, pH 9.5) przez 5-10 minut w temperaturze pokojowej. Reakcję przerywano poprzez płukanie membrany w wodzie. Membrany skanowano z użyciem skanera Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-rad), następnie poddano analizie densytometrycznej za pomocą oprogramowania Image Lab 5.2. Wyniki przedstawiano jako krotność sygnału uzyskanego dla próby kontrolnej (komórki niestymulowane).

## **6.19. Oznaczanie poziomu BDNF testem ELISA**

### **6.19.1. Stymulacja komórek**

A) Zawiesinę komórek PC12 (0,5x10<sup>6</sup> komórek/dołek w 0,5 ml medium DMEM do hodowli) wysiewano do dołków płytki 12-dołkowej opłaszczonej poli-L-lizyną. Następnego dnia medium hodowlane zmieniono na DMEM bez surowicy. W celu zbadania wpływu yolkiny na produkcję i wydzielanie BDNF w czasie, komórki PC12 stymulowano yolkiną o stężeniu 100 µg/ml i inkubowano przez 2, 6 i 24 godziny w 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. W celu zbadania zmian w poziomie produkowanego BDNF, zależnych od dawki yolkiny, komórki stymulowano yolkiną o stężeniu 10, 100 i 150 µg/ml przez 6 godzin w 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane. Po upływie czasu stymulacji zebrano supernatanty.

B) Zawiesinę komórek H19-7 (3x10<sup>5</sup> komórek/dołek w 0,5 ml medium DMEM do hodowli) wysiewano do dołków 12-dołkowej płytki. Następnego dnia medium hodowlane zmieniono na DMEM bez surowicy. W celu zbadania wpływu yolkiny na produkcję i wydzielanie BDNF komórki linii H19-7 stymulowano yolkiną (10 i 100 µg/ml) i inkubowano przez 6, 24, 48 oraz 72 godziny w 33°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane. Po upływie czasu stymulacji zebrano supernatanty.

### **6.19.2. ELISA**

Poziom BDNF w supernatantach z punktu 6.19.1. mierzono za pomocą testu ELISA przy użyciu komercyjnego testu ELISA BDNF Emax ImmunoAssay Systems (Promega) zgodnie z zaleceniami producenta. 96-dołkową płytkę MaxiSorp (Nunc) opłaszczano przeciwciałami monoklonalnymi anti BDNF (1:1000; 100µl/dołek) rozpuszczonymi w buforze węglanowym (0,025 M NaHCO<sub>3</sub>; 0,025 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.7) i inkubowano przez noc w 4°C. Po przepłukaniu płytki buforem TBST blokowano miejsca nieswoiście wiążące immunoglobuliny za pomocą roztworu blokującego przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Płytkę ponownie płukano TBST, a następnie nanoszono rekombinowane białko BDNF jako standard (7,8 – 500 pg/ml) oraz badane supernatanty i inkubowano przez noc w 4°C. Następnie płytkę przepłukano pięciokrotnie TBST i inkubowano z poliklonalnymi przeciwciałami wykrywającymi BDNF (1:500; 100µl/dołek) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po pięciokrotnym przepłukaniu płytki buforem TBST nanoszono koniugat anti-IgY HRP (1:200; 100µl/dołek) i inkubowano 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po odpłukaniu niezwiązanego koniugatu dodano substrat dla peroksydazy chrzanowej - TMB (tetrametylobenzodynę; 100µl/dołek). Po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej, w ciemności, reakcję zatrzymywano dodając 1N HCl (100µl/dołek) po czym zmierzono absorbancję przy długości fali λ=450 nm. Stężenie BDNF w badanych próbach wyliczono na podstawie krzywej standardowej.

## 6.20. Pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia

Komórki z wyjściowej hodowli zebrano i przygotowano zawiesinę komórek o gęstości  $2 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ . Następnie komórki odwirowano przez 2 minuty przy 200xg, a osad zawieszono w 100  $\mu\text{l}$  buforu reakcyjnego (Tabela 6.5). Aby zbadać uwalnianie jonów wapnia z zasobów wewnątrzkomórkowych komórki użyto buforu bez wapnia, natomiast w celu zbadania wpływu yolkiny na receptory na powierzchni komórki i ich aktywację, użyto buforu z wapniem (Tabela 6.5). Komórki ponownie wirowano przez 2 minuty przy 200xg, następnie zawieszono w 100  $\mu\text{l}$  buforu reakcyjnego oraz 100  $\mu\text{l}$  buforu przygotowanego zgodnie z zaleceniem producenta zestawu Fluo-4 Direct Calcium Assay Kits (Invitrogen). Bufor ten zawiera indykator fluorescencyjny Fluo-4 AM oraz probenecid (5mM), który hamuje wypływ barwnika z komórki. Tak przygotowaną zawiesinę komórek inkubowano w ciemności przez 30 minut w 37°C w probówce typu Eppendorf. Po inkubacji naniesiono po 100  $\mu\text{l}$  inkubowanej zawiesiny komórek do dołków 96-dołkowej czarnej płytki (wykorzystywanej do pomiarów fluorescencji), po czym rozpoczęto pomiar fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 494 nm i emisji 516 nm. Przez pierwszych 35 minut mierzono wartość fluorescencji w komórkach niestymulowanych, aż do momentu jej stabilizacji. Następnie komórki stymulowano yolkiną (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) i mierzono zmiany fluorescencji w czasie przez 60 minut. Kontrolę pozytywną stanowiła trifluoperazyna (TFP; 200  $\mu\text{M}$ ). Pomiar fluorescencji w czasie wykonano w czytniku Synergy H4 Hybrid Reader (Biotek, Winooski, USA).

Tabela 6.5. Skład buforów reakcyjnych

Składniki (H <sub>2</sub> O)	Bufor z Ca <sup>2+</sup>	Bufor bez Ca <sup>2+</sup>
	C <sub>końcowe</sub>	C <sub>końcowe</sub>
NaCl	125 mM	125 mM
KCl	5 mM	5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM	1,2 mM
Głukoza	6 mM	6 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,2 mM	-
Hepes (pH 7.5)	25 mM	25 mM

## 6.21. Pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu cyklicznego adenozy-3',5'-monofosforanu (cAMP)

### 6.21.1. Stymulacja komórek

Zawiesinę komórek ( $2 \times 10^5$  komórek/600 $\mu\text{l}$ /dołek) w medium Opti-MEM wysiewano do dołków płytki 48-dołkowej opłaszczonej poli-L-lizyną i inkubowano do następnego dnia (PC12 w 37°C, H19-7 w 33°C, atmosfera 5% CO<sub>2</sub>). Po tym czasie komórki traktowano yolkiną (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) przez 15, 30 i 60 minut. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane adenozyzną (25  $\mu\text{M}$ ) przez 30 minut. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane. Po zakończeniu stymulacji reakcję przerywano inkubując płytkę przez 5 minut w 99°C, a po wystudzeniu zamrażano ją w -20°C. Po rozmrożeniu płytki, z dołków zbierano lizaty komórkowe i wirowano przez 5 minut przy 15 800xg w 4°C. W uzyskanych supernatantach komórkowych oznaczono poziom cAMP testem ELISA.

### 6.21.2. ELISA

Poziom cAMP mierzono za pomocą testu immunoenzymatycznego z wykorzystaniem króliczych przeciwciał poliklonalnych o wysokiej swoistości wobec cAMP. Test został opracowany przez dr Kobiałkę pod kierunkiem Profesora Wojciecha Gorczycy w Laboratorium Białek Sygnałowych w IITD [patent o numerze: PL 18=95751 B1; [243]. Płytkę 96-dołkową opłaszczono koniugatem tyreoglobuliny z cAMP (Tyr-cAMP) (0,5µg/ml), lub samą tyreoglobuliną (0,5µg/ml), która stanowiła kontrolę oddziaływań niespecyficznych i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. W celu zablokowania niespecyficznych wiązań dołki napełniono 0,2% roztworem kazeiny w PBS i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie płytkę dwukrotnie płukano roztworem kazeiny w PBS, po czym umieszczono w łaźni lodowodnej i naniesiono badane próby. Aby zwiększyć czułość testu, próby badane oraz wzorcowe roztwory nukleotydów (200 µl) poddano najpierw acetylacji, dodając mieszaninę acetylującą trietyloaminy i bezwodnika octowego (5 µl; v/v 2:1). Po 5 minutach od acetylacji dodano do próbek 20 µl roztworu surowicy anti-cAMP (1:100) w PBS-T i inkubowano przez 2 godziny w 4°C. Tak przygotowane próbki nanoszono po 100 µl do dołek płytki 96-dołkowej w dwukrotnym powtórzeniu, następnie płytkę inkubowano przez 1 godzinę w 4°C w łaźni wodno-lodowej. Po zakończeniu czasu inkubacji zawartość dołek usuwano i przepłukiwano trzykrotnie 0,2% roztworem kazeiny. Następnie płytkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z drugorzędowymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko IgG królika, sprzężonymi z peroksydazą chrzanową Anti-Rabbit-HRP Conjugate (1:20000, 100 µl/dołek). Po zakończonej inkubacji płytkę płukano dwukrotnie 0,2% roztworem kazeiny, następnie samym PBS i dodawano po 100 µl substratu dla HRP (bufor fosforanowo-cytrynianowy pH 5,0, 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna w metanolu i 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i inkubowano aż do osiągnięcia odpowiedniej barwy próbek (ok. 20 minut). Reakcję zatrzymano dodając po 100 µl na dołek 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, po czym zmierzono absorbancję przy długości fali λ=450 nm w aparacie Dynatech MR-5000. Stężenie cyklicznego AMP w badanych próbach wyliczono na podstawie absorbancji dla krzywej standardowej. Wyniki pomiarów wyrażono w procentach. Uzyskane stężenie dla prób stymulowanych yolkiną lub adenozyną normalizowano w stosunku do stężenia cAMP w komórkach niestymulowanych (grupa kontrolna, 100%).

### 6.22. Pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu ROS testem DCFH

Test DCFH służy do ilościowej oceny stężenia reaktywnych form tlenu (ROS) w żywych komórkach. Wykorzystuje on związek diocyan 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCFH-DA), który swobodnie przechodzi przez nienaruszoną błonę komórkową. DCFH-DA przenika do komórki, gdzie ulega deacetylacji przez esterazy komórkowe do niefluorescencyjnego związku, który jest następnie utleniany przez ROS do 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF). DCF jest wysoce fluorescencyjna i jest wykrywana za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej ze wzbudzeniem przy 485 nm, emisją przy 527 nm [244].

Zawiesinę komórek PC12 (1x10<sup>4</sup>komórek/dołek w 100 µl DMEM do hodowli) wysiewano do dołek płytki 96-dołkowej opłaszczonej poli-L-lizyną. Komórki hodowano przez 24 godziny w 37°C przy 5% nasyceniu CO<sub>2</sub>. Następnego dnia usunięto znad komórek medium, dodano po 100 µl/dołek 50 µM roztworu DCFH-DA w DMEM wzbogaconym w 1% FBS, po czym komórki inkubowano przez 30 minut w 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Następnie usunięto roztwór DCFH-DA, a komórki przepłukano dwukrotnie DMEM bez surowicy. W pierwszym etapie badań zbadano czy yolkiną indukuje w komórkach PC12 zmiany w wewnątrzkomórkowym poziomie ROS. W tym celu komórki PC12 inkubowano z yolkiną (0,1, 1, 10, 100 µg/ml) lub Troloxem (10 µM) silnym antyoksydantem przez 60 minut w 37°C przy 5% CO<sub>2</sub>. Kontrolę pozytywną stanowił 75 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

W celu określenia regulatorowego wpływu yolkiny na wewnątrzkomórkowy poziom ROS, komórki PC12 inkubowano równocześnie z yolkiną (0,1, 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) oraz z 75  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  przez 60 minut w 37°C przy 5%  $\text{CO}_2$ . Próbę referencyjną stanowiły komórki traktowane 75  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  w obecności 10  $\mu\text{M}$  Troloxu. Kontrolę pozytywną stanowił 75  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Intensywność fluorescencji mierzono przy wzbudzeniu/emisji przy 485 nm/527 nm w czytniku Enspire™ 2300 (Perkin Elmer, Waltham, USA). Obserwowane zmiany wyrażono w % względem kontroli pozytywnej ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), dla której odczytaną fluorescencję określono jako 100% tworzenia ROS.

### **6.23. Pomiar aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH**

Ocenę zdolności yolkiny do usuwania wolnych rodników przeprowadzono na jej wodnych roztworach o stężeniach 0,1, 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ . Do 1 ml roztworu yolkiny dodawano 1 ml etanolu (98%). Reakcję rozpoczynano dodając 0,5 ml 0,3 mM etanolowego roztworu stabilnego rodnika DPPH (rodnik 2,2-difenyl-1-pikrylohydrazylowy). Próbę inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej, a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 517 nm z użyciem czytnika UviLine 9400 (SI Analytics). Roztworem wzorcowym, do którego odnoszono absorbancję prób był roztwór Troloxu w stężeniach 0,2-20  $\mu\text{g/ml}$ . Zdolność yolkiny do usuwania wolnych rodników DPPH wyrażono jako  $\mu\text{M}$  Trolox<sub>eq</sub>.

### **6.24. Pomiar aktywności przeciwutleniającej metodą FRAP**

Aktywność przeciwutleniającą yolkiny określono dla preparatów o stężeniach 0,1, 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ . W tym celu wykorzystano spektrofotometryczną metodę oznaczenia siły antyoksydacyjnej FRAP (ang. ferric reducing antioxidant power assay). Metoda ta określa zdolność redukcji stopnia utlenienia jonów żelaza Fe(III) do Fe(II). Mieszaninę reakcyjną zawierającą 3 ml roztworu FRAP (300 mM bufor octowy pH 3.6; 10 mM 2,4,6-tripirydylo-S-triazyna (TPTZ); 20 mM wodny roztwór  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10:1:1 v/v)) oraz 1 ml roztworu yolkiny inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie zmierzono absorbancję przy długości fali 593 nm (czytnik UviLine 9400, SI Analytics). Roztworem wzorcowym, do którego odnoszono absorbancję roztworów yolkiny był roztwór ( $\text{FeSO}_4$ ) o znanym stężeniu. Zdolność yolkiny do redukcji jonów Fe(III) wyrażono jako  $\mu\text{g}$   $\text{Fe}^{2+}$ .

### **6.25. Pomiar aktywności przeciwutleniającej metodą chelatowania jonów żelaza (II)**

Zdolność yolkiny do chelatacji jonów żelaza określono dla preparatów o stężeniach: 0,1, 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ . Przygotowano mieszaninę reakcyjną w postaci 0,25 ml roztworu yolkiny, 1,25 ml wody i 0,11 ml 1 mM  $\text{FeCl}_2$ . Po 2 minutach inkubacji do mieszaniny dodano 1 ml 0,5 mM wodnego roztworu ferrozyny i inkubowano kolejne 10 minut. Po tym czasie zmierzono absorbancję roztworów przy długości fali 562 nm. Do obliczenia zdolności yolkiny do chelatowania jonów żelaza wykorzystano krzywą standardową otrzymaną z roztworów  $\text{FeCl}_2$  (0-20  $\mu\text{g/ml}$ ). Zdolność chelatowania jonów Fe(II) przez yolkinę wyrażono jako  $\mu\text{g}$   $\text{Fe}^{2+}$ .

Badania aktywności przeciwutleniającej yolkiny (rozdziały 6.23-6.26) wykonano we współpracy z dr hab. inż. Aleksandrą Zambrowicz z Katedry Rozwoju Funkcjonalnych Produktów Żywnościowych Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

## 6.26. Pomiar agregacji A $\beta$ 1-42 przy użyciu tioflawiny T (ThT)

Wpływ yolki na proces agregacji A $\beta$ 1-42 zbadano metodą fluorescencyjną z użyciem barwnika Tioflawiny T (ThT, ang. Thioflavin T). ThT jest solą benzotiazolu, która wiążąc się ze strukturami  $\beta$ -kartki białek amyloidogennych pozwala na ilościową ocenę obecności form fibrylarnych.

Do analizy przygotowano następujące próbki:

1. barwnik THT w PBS
2. barwnik THT, yolki (100  $\mu$ g/ml) w PBS
3. barwnik THT, A $\beta$ 1-42 (20  $\mu$ M) w PBS
4. barwnik THT, A $\beta$ 1-42 (20  $\mu$ M), yolki (100  $\mu$ g/ml) w PBS

A $\beta$ 1-42 przygotowano według procedury opisanej w rozdziale Metody, punkt 6.14.1. ThT rozpuszczono w sterylnym buforze fosforanowym (100 mM, pH 7,4) do końcowego stężenia 10  $\mu$ M i mieszano na wytrząsarce wortex przez 10 min w temperaturze pokojowej. Proces agregacji A $\beta$ 1-42 (20  $\mu$ M) mierzono w obecności lub nieobecności yolki (100  $\mu$ g/ml) przy użyciu czarnych 96-dółkowych płytek przeznaczonych do pomiaru fluorescencji. ThT dodano do mieszaniny reakcyjnej tuż przed rozpoczęciem pomiaru. Ostateczna objętość próbek wynosiła 100  $\mu$ l. Zmiany w poziomie fluorescencji monitorowano przez ponad 30 godzin w temperaturze 37°C w czytniku mikropłytek CLARIOstar® (BMG LabTech). Długość fali wzbudzenia i emisji ustawiono odpowiednio na 440 i 480 nm. Eksperyment powtórzono trzykrotnie, w trzech technicznych powtórzeniach dla każdej próby badanej (n=9). Roztwór ThT użyto jako ślepej próby w celu wyeliminowania autofluorescencji. Pojedynczy punkt pomiarowy przedstawiony na wykresie oparty jest na wartości średniej z trzech niezależnych eksperymentów, a słupki błędów reprezentują ich odchylenie standardowe.

## 6.27. Ocena stopnia agregacji A $\beta$ 1-42 z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM)

W celu zobrazowania oddziaływań yolki z agregującym A $\beta$ 1-42 wykorzystano technikę transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM, ang. transmission electron microscopy). A $\beta$ 1-42 przygotowano według procedury opisanej w rozdziale Metody, punkt 6.14.1. Proces agregacji A $\beta$ 1-42 (10  $\mu$ M) w obecności lub nieobecności yolki (100  $\mu$ g/ml) przeprowadzono przez 24 i 48 godzin w temperaturze 37°C w probówce typu Eppendorf. Końcowa objętość próbek wynosiła 100  $\mu$ l. Po upływie czasu inkubacji próbki utrwalano 24 godziny poprzez dodanie 100  $\mu$ l 2,5% aldehydu glutarowego. Tak przygotowane próbki umieszczono na siatkach miedzianych (400 Mesh) z folią formwarową i powłoką węglową (Agar Scientific, Stansted, Wielka Brytania). Przygotowane próbki kontrastowano z 2% octanem uranylu (MicroShop, Piaseczno, Polska). Obrazowanie wykonano przy użyciu mikroskopu JEOL 1200 (JEOL Japan), który wykonał zdjęcia losowo wybranych przez siebie obszarów badanej próbki.

Badania wykonano we współpracy z dr hab. Krzysztofem Pawlikiem oraz dr Pawłem Migdałem z Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów w IITD PAN we Wrocławiu.

## 7. Wyniki

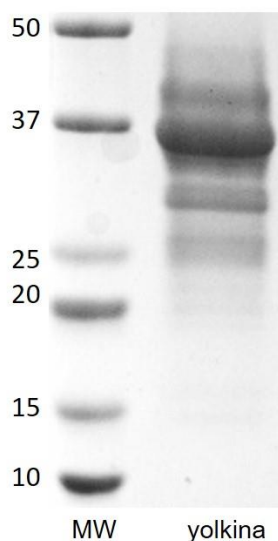
### 7.1. Charakterystyka kompleksu peptydowego yolkina

#### 7.1.1. Ocena czystości i stabilności preparatu yolkina

Do tej pory w badaniach nad yolkiną wykazano, że kompleks ten składa się z peptydów o masie cząsteczkowej rzędu 1-35 kDa, które bogate są w aminokwasy kwasowe Asp/Asn oraz Glu/Gln, i ubogie w metioninę. Dodatkowo, wiadomo, że peptydy yolkina o masie większej niż 16 kDa są glikoproteinami, a ich sekwencja aminokwasowa odpowiada sekwencji witellogeniny II, rozpoczynając od pozycji alaniny 1572. Natomiast mniejsze peptydy o masie od 4 do 12 kDa charakteryzują się brakiem reszt cukrowych, a ich *N*-koniec odpowiada pozycji metioniny 1732 w łańcuchu polipeptydowym witellogeniny II [220].

W pierwszym etapie badań charakteryzowano preparat yolkina wyizolowany według procedury opisanej w *Materiałach i metodach*, podpunkt 6.8. Wyizolowaną i oczyszczoną yolkinę (liofilizat) rozpuszczono w sterylnym PBS (1mg/ml), oznaczono stężenie białka metodą BCA i sprawdzono jej czystość mikrobiologiczną za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu Endozyme. Czystość i skład preparatu yolkina oznaczono za pomocą rozdziału elektroforetycznego w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

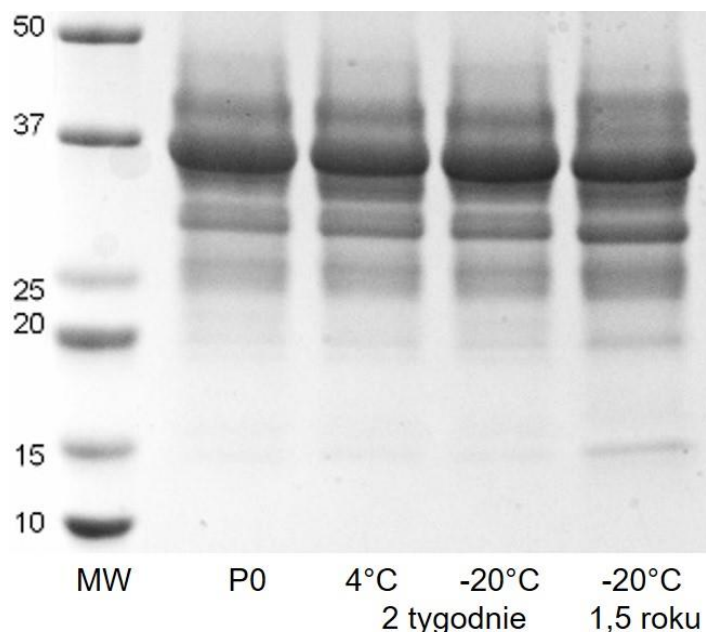
Rozdział SDS-PAGE preparatu yolkina wykazał przeważającą obecność peptydów o masie cząsteczkowej ok. 37 kDa, a także w mniejszej ilości peptydy mieszczące się w zakresie masy 25-37 kDa oraz >37 kDa (Rys. 7.1). Na żelu widoczne były niewielkie ilości peptydów <20kDa. Ponadto, test Endozyme nie wykrył w preparacie yolkina zanieczyszczeń mikrobiologicznych.



**Rys.7.1 Rozdział elektroforetyczny peptydów yolkina w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.** Do studzienki żelu naniesiono białkowy standard masy (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo-Scientific) oraz 20 µg yolkina. Próbkę poddawano elektroforezie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Białka w żelu wybarwiano Coomassie Brilliant blue R-250. Zdjęcie żelu wykonano w aparacie Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-Rad).

Kolejnym etapem było sprawdzenie stabilności roztworu yolkina przechowywanego przez okres dwóch tygodni w temperaturze 4°C lub w -20°C oraz 1,5 roku w -20°C. Kontrolę odnośnikową stanowił liofilizat yolkina rozpuszczony w PBS bezpośrednio przed wykonaniem analizy (Po). Roztwory yolkina naniesiono na żel poliakrylamidowy, rozdzielono elektroforetycznie w warunkach denaturujących i porównano białka wybarwione i widoczne na żelu.

Analiza porównawcza preparatów yolkiny przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych nie wykazała znaczących różnic w ilości i intensywności prążków w żelu (Rys.7.2). Jedynie w przypadku dłuższego przechowywania (-20°C, 1,5 roku) zwiększyła się ilość peptydów o masie ok. 20 i 15 kDa. Uzyskany wynik świadczy o tym, że roztwór yolkiny jest bardzo stabilny i może być bezpiecznie przechowywany krótkoterminowo w 4°C i -20°C oraz dosyć dobrze znosi przechowywanie długoterminowe w -20°C

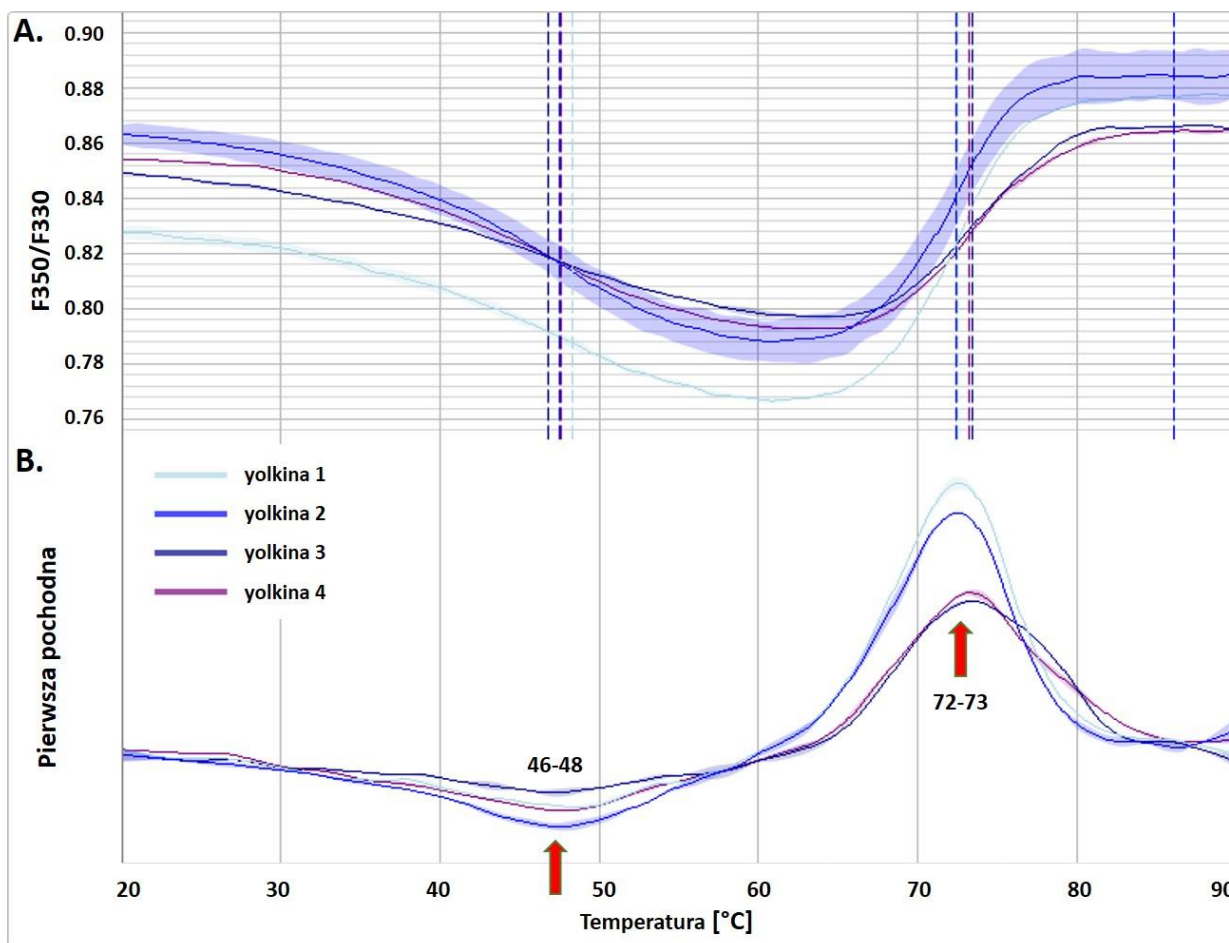


**Rys.7.2 Rozdział elektroforetyczny preparatów yolkiny, przechowywanych w różnych temperaturach (4°C i -20°C), w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.** Do studzienki żelu naniesiono białkowy standard masy (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo-Scientific) oraz 20 µg yolkiny rozpuszczonej bezpośrednio przed analizą (P0), przechowywanej 2 tygodnie w 4°C, 2 tygodnie w -20°C oraz 1,5 roku w -20°C. Próbkę poddawano elektroforezie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Białka w żelu wybarwiano Coomassie Brilliant blue R-250. Zdjęcie żelu wykonano w aparacie Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-Rad).

W kolejnym kroku oceniono stabilność termiczną czterech niezależnie uzyskanych preparatów yolkiny, z wykorzystaniem platformy Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies GmbH). Proces rozfałdowania termicznego białka badano stosując liniowy wzrost temperatury 1°C/min w zakresie od 20°C do 90°C.

Wykazano, że cztery niezależnie izolowane preparaty yolkiny mają porównywalny profil rozfałdowania, z pierwszą temperaturą topnienia w zakresie 46-48°C i drugą w 72-73°C (Rys. 7.3). W tabeli 7.1 przedstawiono dokładną wartość temperatur topnienia dla poszczególnych preparatów yolkiny wraz z odchyleniem standardowym.





**Rys.7.3 Profil stabilności termicznej czterech preparatów yolkiny (1-4).** Proces rozkładowania termicznego białek badano stosując liniowy wzrost temperatury 1°C/min w zakresie od 20°C do 90°C. **A)** Zmiany fluorescencji mierzono dla 350 nm oraz 330 nm i przedstawiono jako ich stosunek (F350/330). Pionowe przerywane linie odpowiadają temperaturze topnienia dla wybranego preparatu yolkiny (1-4). **B)** Wykres przedstawiający pierwszą pochodną wykreśloną w funkcji temperatury. Eksperyment przeprowadzono z wykorzystaniem platformy Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies GmbH). Analizę danych przeprowadzono przy użyciu programów PR.Therm Control i PR.Stability Analysis (NanoTemper Technologies GmbH).

**Tabela 7.1** Temperatury topnienia dla czterech preparatów yolkiny wraz z odchyleniem.

Próbka	Tm1	$\Delta Tm1$	Tm2	$\Delta Tm2$
yolkin 1	47.64	0.10	73.29	0.09
yolkin 2	46.76	0,89	73.43	0.16
yolkin 3	47.47	0.16	72.46	0.06
yolkin 4	48.34	0.62	72.57	0.03

### 7.1.2. Identyfikacja yolkiny metodą spektrometrii mas

Pierwsza praca opisująca peptydy wchodzące w skład preparatu yolkiny została opublikowana przez grupę Profesora Polanowskiego. Stosując technikę Edmana, udało się zidentyfikować część peptydów yolkiny rozdzielonych metodą SDS-PAGE. Wykazano, że *N*-koniec peptydów yolkiny jest homologiczny z *C*-końcową sekwencją witellogeniny II [220]. Metoda Edmana ma jednak pewne ograniczenia. W zależności od ilości próbki pozwala zsekwencjonować od 10-50 reszt aminokwasowych. Ponadto jest metodą pracochłonną, która wymaga dużej ilości oczyszczonego białka. Dużo dokładniejszą i bardziej precyzyjną metodą jest analiza z użyciem

spektrometrii mas (MS), która wyparła stosowaną kiedyś degradację Edmana. W celu uzupełnienia charakterystyki peptydów zawartych w yolkinie wykorzystano technikę MS.

Analiza za pomocą techniki spektrometrii mas wykazała obecność 19 peptydów, których sekwencja aminokwasowa jest homologiczna do części sekwencji aminokwasowej witellogeniny II (Tab.7.2). Pokrycie sekwencji wyniosło 9,70%, co jest dobrym wynikiem, ponieważ odnosi się do udziału pokrycia sekwencji aminokwasowej zidentyfikowanych peptydów yolkiny o długości od 7-23 reszt aminokwasowych w porównaniu z całą sekwencją witellogeniny II o długości 1850 reszt aminokwasowych. Wynik „score” dla peptydów uzyskał wysoką wartość wynoszącą 1099,12, świadczy to o bardzo dobrym dopasowaniu wyszukiwanych peptydów do sekwencji w bazie Mascot.

W eksperymencie wykazano również obecność 12 peptydów homologicznych do witellogeniny I. Pokrycie sekwencji wyniosło 6,60% i jest to również dobry wynik, ponieważ zidentyfikowano peptydy yolkiny o długości od 6-23 reszt aminokwasowych, natomiast łańcuch polipeptydowy witellogeniny I ma długość 1912 reszt aminokwasowych. Wynik „score” dla peptydów uzyskał również wysoką wartość wynoszącą 795,61, co świadczy o bardzo dobrym dopasowaniu wyszukiwanych peptydów do sekwencji w bazie Mascot.

Dodatkowo, siedem peptydów wykazało homologię do sekwencji aminokwasowej owalbuminy, która jest białkiem występującym w dużej ilości w kurzych jajach, stąd wniosek, że yolkina mogła zostać zanieczyszczona owalbuminą podczas izolacji. Pokrycie sekwencji wyniosło 28,50%, wynik jest wysoki z racji dużo mniejszej długości łańcucha peptydowego albuminy wynoszącego 386 reszt aminokwasowych. Wynik „score” wyniósł mniej niż w poprzednich analizach (451,25) jednak wciąż jest to wynik świadczący o dobrym dopasowaniu wyników z bazą Mascot.

Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze badania nad składem peptydowym yolkiny i homologią do witellogeniny II. Ponadto wnoszą dodatkowe informacje o zawartości peptydów homologicznych do witellogeniny I i niewielkim zanieczyszczeniu owalbuminą pochodzącą z białka kurzych jaj.

**Tabela 7.2 Wyniki uzyskane za pomocą techniki MS.**

Cmpd.		No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z	z	Rt [min]	Wynik	P	Zakres	Sekwencja	Modyfikacja
<b>Białko 1:</b> Vitellogenin-2 OS=Gallus gallus OX=9031 GN=VTG2 PE=1 SV=1											
<b>Numer dostępu:</b> VIT2_CHICK						<b>Wynik:</b> 1099,12					
<b>Baza danych:</b> SwissProt						<b>MW [kDa]:</b> 204,70					
<b>Pokrycie sekwencji [%]:</b> 9,70 %						<b>pl:</b> 9,23					
						<b>Liczba peptydów:</b> 19					
<b>Modyfikacje:</b> Karbamidometyl (Carbamidomethyl), Utlenianie (Oxidation)											
570	6	542.7625	-2.56	2	17.5	27.0	1	1579-1587	K.ARCSVSYNK.I	Carbamidomethyl: 3	
1314	2	429.1936	-2.55	2	21.1	36.6	0	1581-1587	R.CSVSYNK.I	Carbamidomethyl: 1	
2726	20	489.7839	-1.35	2	27.3	46.0	1	1588-1595	K.IKTFNEVK.F		
974	17	445.7314	-2.51	2	19.5	69.5	0	1624-1632	K.SAGEATNLK.A		
4656	2	715.4102	8.47	2	35.4	22.4	1	1624-1637	K.SAGEATNLKAINIK.I		
2280	4	888.9399	1.54	2	25.3	63.4	0	1638-1653	K.IGSHEIDMHPVNGQVK.L	Oxidation: 8	
3858	2	587.6317	3.16	3	32.0	32.6	0	1638-1653	K.IGSHEIDMHPVNGQVK.L		
18232	11	737.4139	4.80	2	101.3	46.6	0	1702-1714	K.TTIQVPLWMAGK.T	Oxidation: 10	
11932	21	729.4167	5.22	2	66.7	54.8	0	1702-1714	K.TTIQVPLWMAGK.T		
5326	13	1069.9330	0.51	2	38.2	95.1	1	1715-1731	K.TCGICGKYDAECEQEYR.M	Carbamidomethyl: 2, 5, 12	
4663	26	681.7656	-2.07	2	35.4	89.0	0	1722-1731	K.YDAECEQEYR.M	Carbamidomethyl: 5	
5688	1	1126.9827	-0.28	2	39.7	55.9	1	1722-1739	K.YDAECEQEYRMPNGYLAK.N	Carbamidomethyl: 5; Oxidation: 11	
9173	45	986.9796	9.33	2	54.3	104.4	0	1740-1756	K.NAVSYFGHSHWILEEAPCR.G	Carbamidomethyl: 16	
2872	30	425.7543	-2.22	2	27.9	40.8	1	1764-1770	R.SFVKLEK.T		
5232	30	509.2815	-1.70	2	37.8	71.1	0	1771-1780	K.TVQLAGVDSK.C		
5892	33	562.7729	-1.75	2	40.6	53.6	0	1781-1789	K.CYSTEPVLR.C	Carbamidomethyl: 1	
7642	9	1166.0686	0.60	2	47.8	80.7	0	1799-1820	K.TTPVTVGHFHCLPADSANS�TDK.Q	Carbamidomethyl: 10	
5	2	478.7288	-0.24	2	12.6	25.3	1	1821-1827	K.QMKYDQK.S	Oxidation: 2	
4336	3	1080.7345	-2.80	3	34.1	22.5	1	1824-1850	K.YDQKSEDMQDTVDAHTTCSCENE.ECST.-	Carbamidomethyl: 18, 20, 25	
<b>Białko 2:</b> Vitellogenin-1 OS=Gallus gallus OX=9031 GN=VTG1 PE=1 SV=1											
<b>Numer dostępu:</b> VIT1_CHICK						<b>Wynik:</b> 795,61					
<b>Baza danych:</b> SwissProt						<b>MW [kDa]:</b> 210,50					
<b>Pokrycie sekwencji [%]:</b> 6,60 %						<b>pl:</b> 9,16					
						<b>Liczba peptydów:</b> 12					
<b>Modyfikacje:</b> Karbamidometyl (Carbamidomethyl), Utlenianie (Oxidation)											
3023	11	872.3934	0.34	2	28.5	72.7	0	1664-1678	K.SCNVVVAQDCTEHPK.F	Carbamidomethyl: 2, 10	
378	1	535.2901	-1.83	2	16.4	36.2	1	1685-1693	R.KVDHQSLSR.E		
6233	13	638.8881	5.18	2	42.0	55.6	0	1745-1756	K.TVIVEAPIHGLK.N		
71	7	532.2399	-0.63	3	13.8	61.2	2	1775-1788	R.GKTCGVCGNNDREK.H	Carbamidomethyl: 4, 7	
663	6	576.7286	-1.79	2	17.9	52.1	0	1777-1786	K.TCGVCGNNDRE.E	Carbamidomethyl: 2, 5	
391	6	705.2992	1.06	2	16.5	67.5	1	1777-1788	K.TCGVCGNNDREK.H	Carbamidomethyl: 2, 5	
1039	3	624.8104	-1.53	2	19.8	54.9	0	1789-1798	K.HNELLMPNHK.L	Oxidation: 6	
7141	17	836.4064	-1.39	3	45.7	71.3	1	1830-1851	K.LNRNPIDGEEESTCYSVDPVLK.	Carbamidomethyl: 14	
691	6	649.2816	-1.96	2	18.1	67.0	1	1852-1861	K.CMKDCTPIEK.T	Carbamidomethyl: 1, 5; Oxidation: 2	
2023	16	431.7018	-1.40	2	24.2	34.2	0	1855-1861	K.DCTPIEK.T	Carbamidomethyl: 2	
9682	13	637.3512	4.08	2	56.4	83.6	0	1874-1884	K.ATAVSLLEWQR.S		
11517	5	1246.4731	0.34	2	64.7	32.0	0	1890-1912	K.SASEDVVESVDADIDCTCTGDCS	Carbamidomethyl: 16, 18, 22	
<b>Białko 3:</b> Ovalbumin OS=Gallus gallus OX=9031 GN=SERPINB14 PE=1 SV=2											
<b>Numer dostępu:</b> OVAL_CHICK						<b>Wynik:</b> 451,25					
<b>Baza danych:</b> SwissProt						<b>MW [kDa]:</b> 42,90					
<b>Pokrycie sekwencji [%]:</b> 28,50 %						<b>pl:</b> 5,19					
						<b>Liczba peptydów:</b> 7					
<b>Modyfikacje:</b> Karbamidometyl (Carbamidomethyl), Utlenianie (Oxidation)											
10972	2	761.0703	6.17	3	62.2	30.8	0	86-105	R.DILNQITKPNVDVYFSLASR.L		
10392	5	762.0663	7.03	3	59.5	36.0	1	106-123	R.LYAERYPIPEYLQCVK.E	Carbamidomethyl: 16	
8563	11	844.4293	6.76	2	51.7	113.3	0	128-143	R.GGLEPINFQTAADQAR.E		
11143	6	929.9948	8.86	2	63.0	102.7	0	144-159	R.ELINSWVESQNTNGIIR.N		
13093	1	1238.6549	-3.65	2	72.3	31.9	0	160-182	R.NVLQPSVSDSQTAMVLVNAIVFK.G	Oxidation: 14	
14113	21	820.7829	7.09	3	77.6	60.0	0	160-182	R.NVLQPSVSDSQTAMVLVNAIVFK.G		
2990	2	887.4568	4.07	2	28.4	76.6	0	324-340	K.ISQAVHAAHAEINEAGR.E		

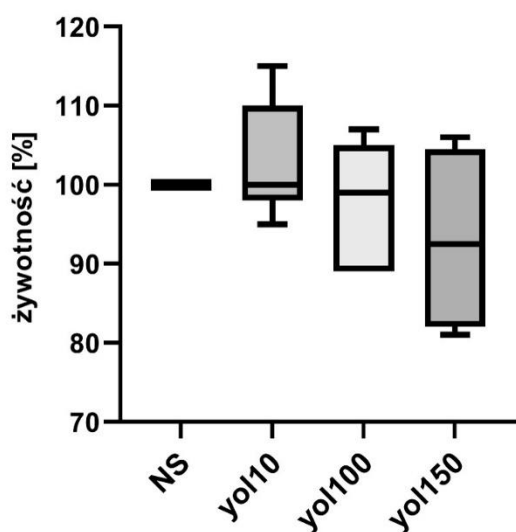
## 7.2. Wybór pierwszego modelu badawczego – linia komórkowa PC12

Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie molekularnego mechanizmu działania preparatu peptydowego yolkina w kontekście produkcji i wydzielania czynnika neurotroficznego BDNF oraz aktywacji szlaków sygnałowych z tym związanych. Modelem komórkowym często wykorzystywanym w badaniach związanych z aktywacją szlaków sygnałowych zaangażowanych w procesy neuroprotekcji, neurosekrecji, synaptogenezy oraz neurotoksyczności są komórki szczurzego guza chromochłonnego nadnerczy PC12 Tet-On (dalej nazywane PC12). Komórki te mają neuroektodermalne pochodzenie oraz zdolność do fenotypowego różnicowania się w kierunku komórek podobnych do neuronów współczulnych w odpowiedzi na NGF. Ponadto komórki PC12 nie posiadają głównego receptora dla białka BDNF – TrkB, co daje możliwość zbadania bezpośredniego wpływu yolkiny na aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, prowadzących do ekspresji *Bdnf* w komórce [239], [240].

### 7.2.1. Ocena wpływu yolkiny na przeżywalność komórek PC12

Wpływ yolkiny (10, 100 i 150  $\mu\text{g/ml}$ ) na przeżywalność komórek PC12 oznaczono za pomocą testu MTT. Kontrolę stanowiły komórki niestymulowane (NS), dla których żywotność przyjęto jako 100%.

Wykazano, że yolkina w stężeniach 10  $\mu\text{g/ml}$  oraz 100  $\mu\text{g/ml}$  nie wpływa na żywotność komórek PC12, natomiast preparat w stężeniu 150  $\mu\text{g/ml}$  wywołał nieznaczny (nieistotny) spadek żywotności komórek do 93% (Rys. 7.4).



**Rys.7.4 Wpływ yolkiny na przeżywalność komórek PC12.** Komórki PC12 stymulowano yolkiną (w stężeniach 10, 100 i 150  $\mu\text{g/ml}$ ) i inkubowano przez 24 godziny w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Kontrolę stanowiły komórki niestymulowane (NS). Przeżywalność komórek oceniano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią wraz z wartościami min-max, obliczonymi dla 4 niezależnych eksperymentów, względem kontroli określonej jako 100%. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta.

## 7.3. Wpływ yolkiny na produkcję neurotrofiny BDNF przez komórki PC12

### 7.3.1. Wpływ yolkiny na wydzielanie dojrzałej formy BDNF (m-BDNF)

Wyniki badań oceniających wpływ yolkiny na funkcje poznawcze u myszy z eksperymentalnym modelem choroby Alzheimera oraz u starzejących się szczurów wykazały, że yolkina poprawiła zdolność uczenia się i zapamiętywania u tych zwierząt [237], [238]. Z tego względu kolejnym ważnym krokiem w badaniach nad wpływem yolkiny na zaobserwowaną

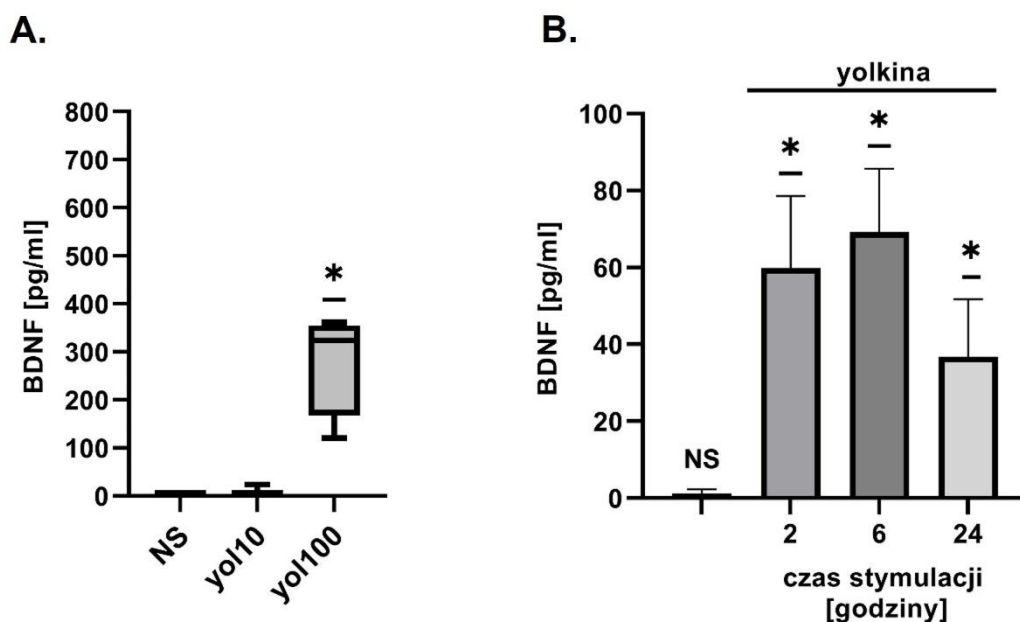
poprawę funkcji poznawczych stało się wyjaśnienie molekularnych podstaw jej działania. Wiele badań wskazuje na to, iż neuroprotektoryjne oraz pro-kognitywne właściwości substancji wspierających układ nerwowy wiążą się z aktywacją szlaków prowadzących do zwiększonej ekspresji i wydzielania neurotrofin. Jednym z istotnych czynników neurotroficznymi, pełniącym istotną rolę w rozwoju i funkcjonowaniu OUN, w tym w procesach uczenia się i tworzenia pamięci, jest neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego – BDNF [91]. Biorąc pod uwagę rolę tego czynnika w funkcjonowaniu układu nerwowego, w kolejnym etapie postanowiono zbadać wpływ yolki (10 µg/ml i 100 µg/ml) na produkcję i wydzielanie białka m-BDNF przez komórki PC12 za pomocą komercyjnie dostępnego testu ELISA (BDNF Emax ImmunoAssay Systems; Promega).

Wykazano, że zarówno kontrolne, niestymulowane komórki PC12 (NS) jak i komórki stymulowane yolką o stężeniu 10 µg/ml (yol10) nie wydzielają m-BDNF do supernatantu. Natomiast stymulacja yolką w dawce 100 µg/ml (yol100) spowodowała istotny wzrost produkcji i wydzielania m-BDNF przez komórki PC12 w ilości ok. 300pg/ml (Rys.7.5 A).

Na podstawie wyników testu MTT badającego wpływ yolki na przeżywalność komórek PC12 oraz testu ELISA pozwalającego zmierzyć poziom wydzielanego m-BDNF przez komórki PC12 określono stężenie yolki bezpieczne dla komórek, które stymuluje je do produkcji znaczących ilości białka m-BDNF. W kolejnych eksperymentach do stymulacji komórek stosowano yolkę o stężeniu 100 µg/ml.

Kolejnym krokiem było sprawdzenie kinetyki wydzielania m-BDNF przez komórki PC12 stymulowane yolką w stężeniu 100 µg/ml, z użyciem testu ELISA.

Stymulacja komórek PC12 yolką (2-24 godziny) wykazała, że wydzielanie m-BDNF przez komórki wzrasta w czasie. Zaobserwowano, że maksymalne wydzielanie m-BDNF (70pg/ml) nastąpiło po 6-ciu godzinach inkubacji z yolką. Po 24 godzinach zaobserwowano istotny spadek poziomu wydzielanego m-BDNF (Rys.7.5 B).

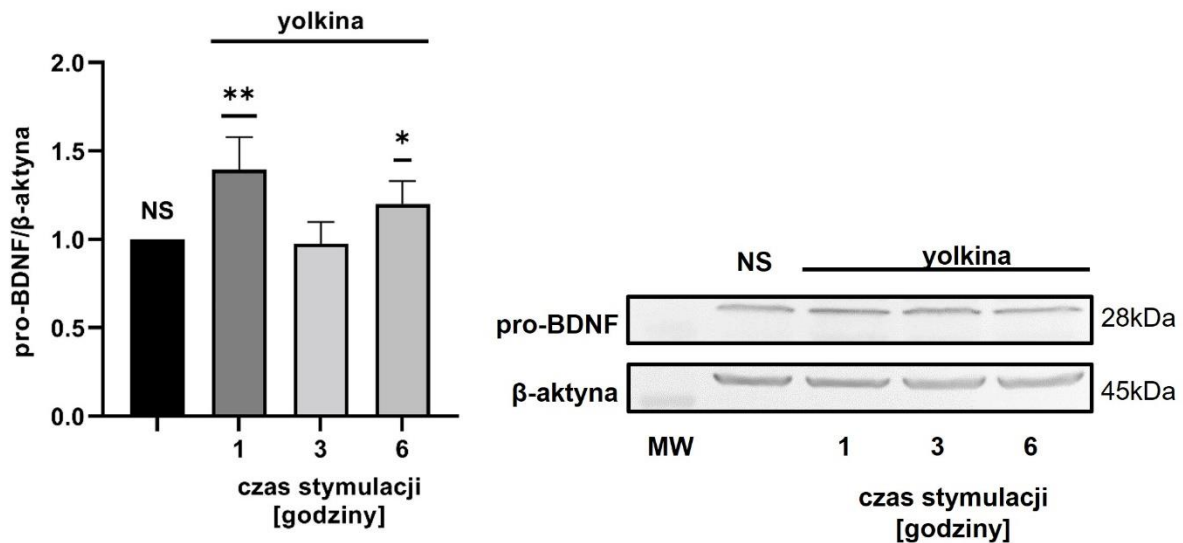


**Rys. 7.5 Wpływ yolki na wydzielanie białka m-BDNF przez komórki PC12.** **A.** Komórki PC12 stymulowano yolkiną o stężeniu 10 µg/ml (yol10) i 100 µg/ml (yol100) przez 6 godzin w 37°C. Po tym czasie supernatanty zebrano i oznaczono w nich stężenie BDNF [pg/ml] za pomocą testu ELISA przy użyciu komercyjnego testu ELISA BDNF Emax ImmunoAssay Systems (Promega) zgodnie z zaleceniami producenta. Kontrolę stanowiły komórki niestymulowane (NS). Wyniki przedstawiono jako wartość średnią stężenia BDNF [pg/ml] wraz z wartościami min-max, obliczonymi dla 4 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t-Studenta. \* $p < 0.05$  vs. kontrola (NS). **B.** Komórki PC12 stymulowano yolkiną o stężeniu 100 µg/ml przez 2, 6 oraz 24 godziny w 37°C. Po tym czasie zebrano supernatanty i oznaczono w nich stężenie BDNF [pg/ml] za pomocą testu ELISA przy użyciu komercyjnego testu ELISA BDNF Emax ImmunoAssay Systems (Promega) zgodnie z zaleceniami producenta. Kontrolę stanowiły komórki niestymulowane (NS). Wyniki przedstawiono jako zależność czasu stymulacji yolkiną (2-24 godziny) od średniego stężenia BDNF [pg/ml] w supernatancie, wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 3 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t-Studenta. \* $p < 0.05$  vs. kontrola (NS)

### 7.3.2. Wpływ yolki na białkowy produkt ekspresji genu *Bdnf*

W celu sprawdzenia czy yolki wpływa na ilość produktu ekspresji genu *Bdnf* na poziomie białka w komórkach PC12 wykorzystano metodę Western Blotting. Ponieważ maksymalne stężenie białka m-BDNF wydzielanego przez komórki PC12 obserwowane było po 6-godzinnej stymulacji yolkiną, wewnątrzkomórkowe zmiany w poziomie białka BDNF badano w czasie 1-6 godzin. Kontrolę stanowiły komórki niestymulowane (NS).

Zaobserwowano, że poziom białka BDNF w komórkach PC12 stymulowanych yolkiną oscyluje w czasie (Rys.7.6). Po 1-godzinnej stymulacji yolkiną poziom pro-BDNF wzrósł 1,4-krotnie w porównaniu z kontrolą (NS). Natomiast po 3 godzinach stymulacji yolkiną poziom pro-BDNF spadł do poziomu kontroli, a potem ponownie wzrósł 1,3-krotnie po 6 godzinach. Otrzymane wyniki sugerują, że stymulacja yolkiną powoduje wzrost produktu ekspresji genu *Bdnf* w postaci białka pro-BDNF (izoforma niedojrzała). Nie zaobserwowano natomiast obecności izoformy m-BDNF (dojrzała izoforma) w komórkach PC12.

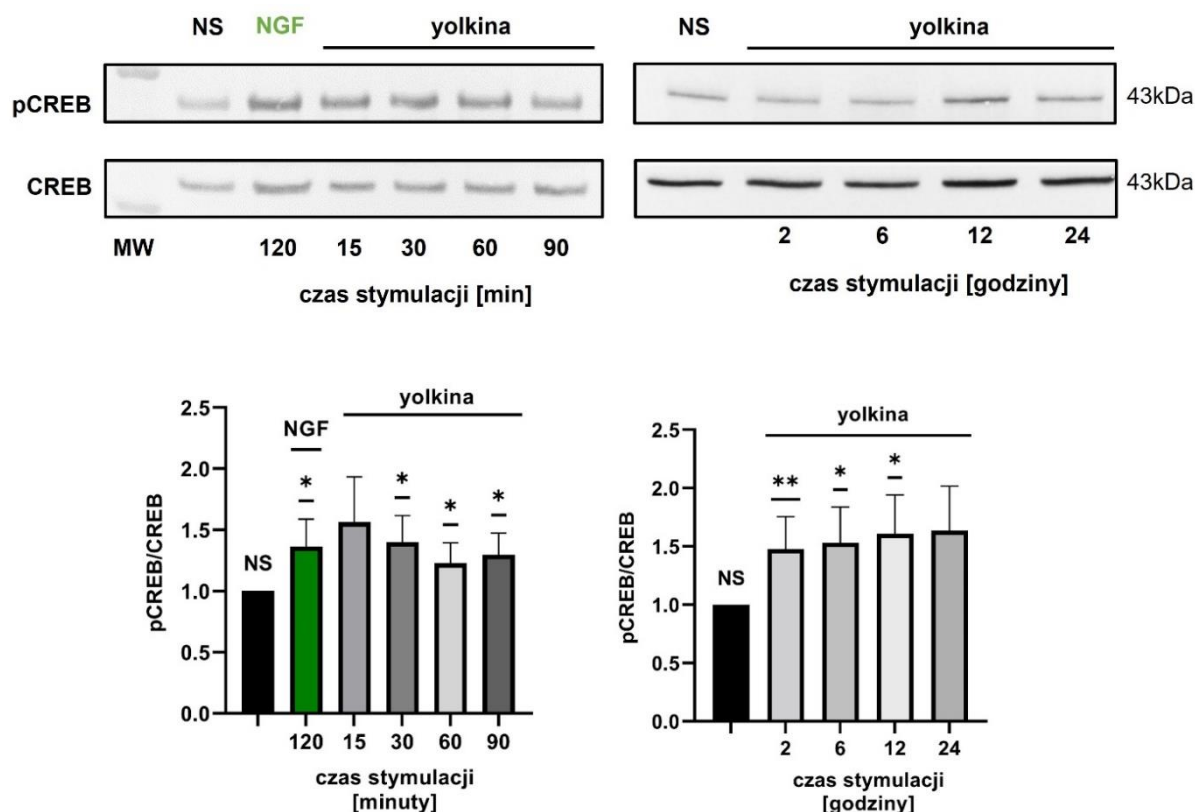


**Rys 7.6. Wpływ yolkiny na wewnątrzkomórkowy poziom białka BDNF w komórkach PC12.** Komórki stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i inkubowano w 37°C w czasie 2-6 godzin. Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję β-aktyny oraz BDNF przeprowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko nim oraz króliczych przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z alkaliczną fosfatazą. Membranę wybarwiano z użyciem mieszaniny substratów (NBT i BCIP) i skanowano z użyciem skanera Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-rad), a następnie poddano analizie densytometrycznej za pomocą oprogramowania Image Lab 5.2. Wyniki przedstawiono jako zależność czasu stymulacji od średniej krotności sygnału uzyskanego dla próby kontrolnej (komórki niestymulowane, NS) wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 6 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.001$  vs. kontrola (NS)

#### 7.4. Wpływ yolkiny na aktywację czynnika transkrypcyjnego CREB w komórkach PC12

Ze względu na wykazaną zwiększoną ilość produktu ekspresji genu *Bdnf* na poziomie białka w komórkach PC12 stymulowanych yolkiną, w kolejnych krokach sprawdzono, jakie ścieżki sygnałowe ulegają aktywacji prowadząc do tego efektu. Jednym z kluczowych czynników transkrypcyjnych, który kontroluje ekspresję genu *Bdnf* oraz genów kodujących inne białka zaangażowane w przeżycie komórek nerwowych, a także procesy plastyczności synaptycznej i tworzenie pamięci, jest czynnik transkrypcyjny CREB. Kluczową rolę w jego aktywacji odgrywa fosforylacja Ser133 przez kinazy wewnątrzkomórkowe [129], [141]. W celu sprawdzenia czy yolkina wpływa na wzrost aktywacji czynnika CREB w komórkach PC12 wykorzystano metodę Western Blotting. Oznaczono zmiany w poziomie fosforylacji Ser133 czynnika CREB w komórkach PC12 inkubowanych z yolkiną w krótkim (15-90 minut) oraz długim (2-24 godziny) czasie. Kontrolę pozytywną stanowił czynnik neurotroficzny NGF.

Wykazano, że w odpowiedzi na yolkinę, w komórkach PC12 zachodzi istotny wzrost fosforylacji Ser133 czynnika CREB już po 30 minutach inkubacji (w porównaniu do komórek kontrolnych (NS)), który utrzymywał się do 12 godzin (Rys 7.7). Można zatem wnioskować, że aktywacja czynnika CREB obserwowana w komórkach PC12 w odpowiedzi na yolkinę może utrzymywać się bardzo długo, co może mieć istotny wpływ zarówno na regulację ekspresji *Bdnf*, jak również innych genów istotnych dla funkcjonowania komórek nerwowych.



**Rys. 7.7. Wpływ yolkiny na aktywację czynnika CREB w komórkach PC12.** Komórki stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i inkubowano w 37°C w czasie 15-90 minut oraz 2-24 godziny. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane NGF (100 ng/ml) przez 120 minut. Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję CREB oraz p-CREB (Ser133) przeprowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko nim oraz króliczych przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z fosfatazą alkaliczną. Membranę wybarwiano z użyciem mieszaniny substratów (NBT i BCIP) i skanowano z użyciem skanera Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-rad), a następnie poddano analizie densytometrycznej za pomocą oprogramowania Image Lab 5.2. Wyniki przedstawiono jako zależność czasu stymulacji od średniej krotności sygnału uzyskanego dla próby kontrolnej (komórki niestymulowane, NS) wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 5 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.001$  vs. kontrola (NS)

### 7.5. Wpływ yolkiny na aktywację szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za fosforylację czynnika transkrypcyjnego CREB w komórkach PC12

W odpowiedzi na czynniki zewnątrzkomórkowe takie jak neuroprzekazniki, ligandy lub czynniki wzrostu, w komórce nerwowej uruchamiane są mechanizmy prowadzące do aktywacji kinaz białkowych odpowiedzialnych za fosforylację czynnika transkrypcyjnego CREB. Najważniejsze z nich obejmują:

- szlaki sygnałowe zależne od wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia
- szlaki sygnałowe zależne od wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP i aktywacji kinazy PKA,
- szlak zależny od kinaz PI3K/AKT
- szlak zależny od aktywacji kinaz MAP (ERK1/2).

Wymienione szlaki prowadzą do aktywacji czynnika CREB, a także zwiększonej ekspresji *Bdnf*. Odgrywają one również istotną rolę w regulacji procesów przeżyciowych komórek, neurogeniezie, neurytogenezie, a także tworzeniu pamięci długotrwałej [129], [133].



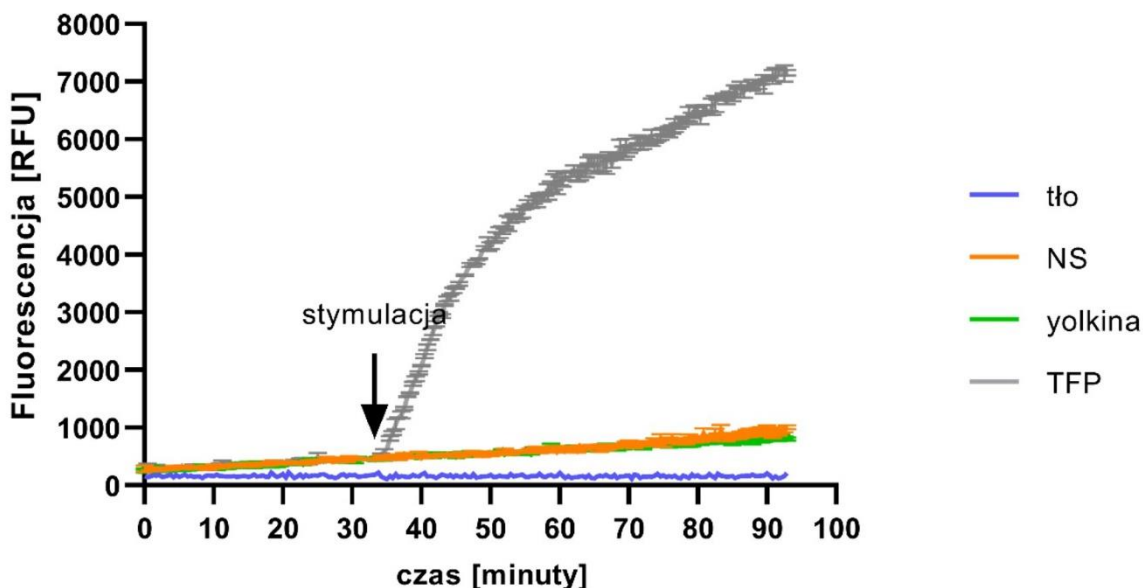
Kolejnym krokiem w badaniach było sprawdzenie czy wyżej wymienione szlaki sygnałowe, odpowiedzialne za aktywację czynnika CREB i ekspresję *Bdnf*, są aktywowane przez kompleks yolkina.

### **7.5.1. Wpływ yolkiny na wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia**

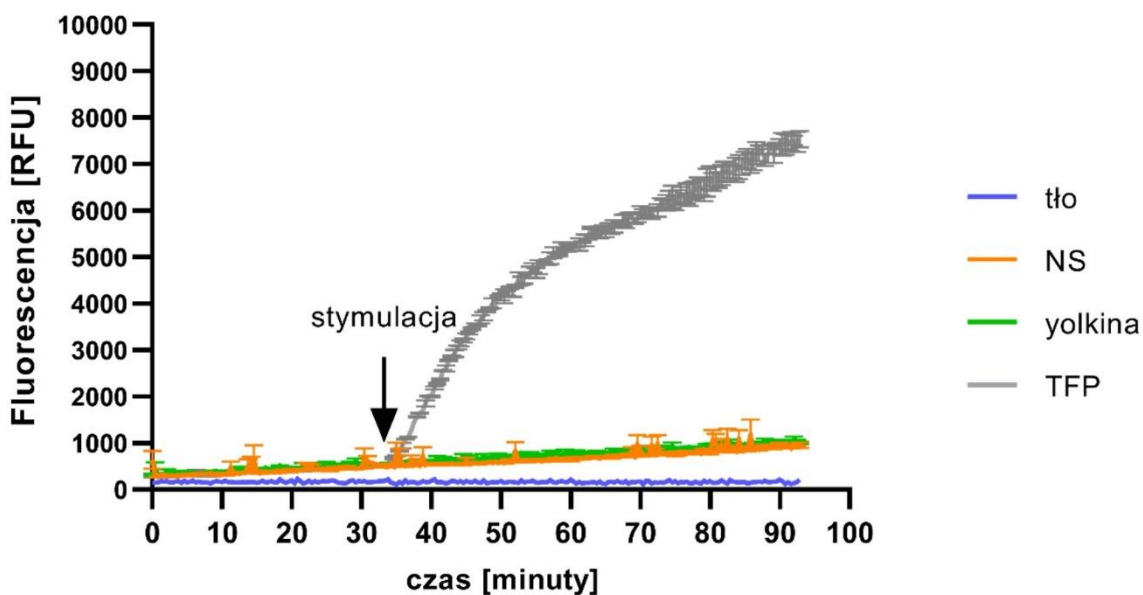
Do wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia może dojść w wyniku napływu jonów wapnia przez błonowe kanały jonowe lub kanały bramkowane ligandem jak również poprzez uwolnienie jonów wapnia zmagazynowanych w retikulum endoplazmatycznym (ER) [162]. W celu zbadania wpływu yolkiny na wnikanie jonów wapnia do komórki przez kanały błonowe w eksperymencie użyto buforu zawierającego jony wapnia. Natomiast, aby zbadać czy yolkina wpływa na uwalnianie jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego, w eksperymencie użyto buforu pozbawionego jonów wapnia. Komórki PC12 stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i obserwowano zmiany fluorescencji w czasie. Kontrolę pozytywną stanowiła trifluoperazyna (TFP; 200 µM), która aktywuje zarówno kanały jonowe dla Ca<sup>2+</sup>, jak i uwalnianie Ca<sup>2+</sup> zmagazynowanego w ER.

Inkubacja komórek PC12 z TFP spowodowała istotny wzrost fluorescencji, co wskazuje na wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w komórkach PC12. Efektu tego nie zaobserwowano natomiast dla komórek stymulowanych yolkiną, które wykazały niski poziom fluorescencji, taki sam jak dla komórek niestymulowanych (NS) (Rys. 7.8 A i B). Można zatem wnioskować, że yolkina pozostaje bez istotnego wpływu zarówno na aktywność kanałów błonowych regulujących napływ jonów wapnia ze środowiska zewnętrznego, jak i uwalnianie Ca<sup>2+</sup> zmagazynowanego w ER.

### A. Bufor z jonami wapnia



### B. Bufor bez jonów wapnia

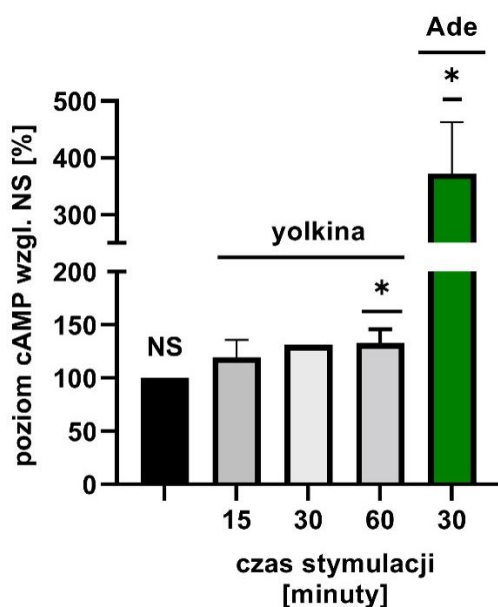


**Rys. 7.8. Wpływ yolkiny na wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia w komórkach PC12.** Zawiesinę komórek PC12 inkubowano z buforem reakcyjnym (zawierającym lub pozbawionym jonów  $Ca^{2+}$ ) oraz z indykatozem fluorescencyjnym Fluo-4 AM, w ciemności przez 30 minut w  $37^{\circ}C$  w probówce typu Eppendorf. Po inkubacji, na 96-dolkową czarną płytkę naniesiono po 100  $\mu$ l inkubowanej zawiesiny komórek i rozpoczęto pomiar fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 494 nm i emisji 516 nm. Przez pierwszych 35 minut mierzono wartość fluorescencji w komórkach niestymulowanych (NS), aż do momentu jej stabilizacji. Następnie komórki stymulowano yolkiną (100  $\mu$ g/ml) lub TFP (200  $\mu$ M) i mierzono zmiany fluorescencji przez kolejne 60 minut. Pomiar fluorescencji w czasie wykonano w czytniku Synergy H4 Hybrid Reader (Biotek, Winooski, USA). Wyniki przedstawiono jako zależność czasu trwania eksperymentu od średniej wartości fluorescencji (RFU) wraz ze standardowym błędem pomiaru (SEM), zmierzonymi dla 3 niezależnych eksperymentów.

## 7.5.2. Wpływ yolkiiny na wewnątrzkomórkowy poziom cAMP i aktywację kinazy PKA

Kolejną cząsteczką, która może uczestniczyć w regulacji ekspresji *Bdnf* zależnej od czynnika CREB jest cAMP. Związanie zewnątrzkomórkowego liganda z receptorami powierzchniowymi GPC powoduje aktywację cyklicznej adenylanowej i wzrost poziomu cAMP w komórce [246]. W ścieżce sygnałowej niezależnej od białka G synteza cAMP zachodzi poprzez aktywację rozpuszczalnej AC przez wodorowęglan ( $\text{HCO}_3^-$ ) i jony wapnia [150]. W celu zbadania zmian w poziomie cyklicznego AMP w komórkach PC12 traktowanych yolkiiną, wykorzystano metodę ELISA. Jako kontrolę pozytywną użyto adenozyne (25  $\mu\text{M}$ ), która powoduje wzrost cAMP w komórkach nerwowych, w ścieżce zależnej od aktywacji receptorów GPC.

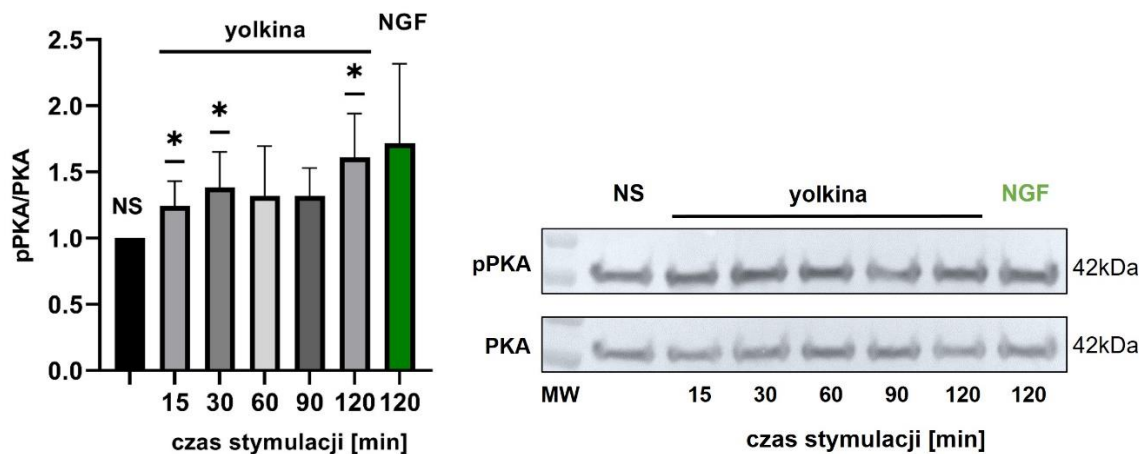
Zaobserwowano, że stymulacja komórek PC12 adenozyną spowodowała 250% wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP w porównaniu do komórek kontrolnych (NS), dla których poziom oznaczono jako 100%. W komórkach PC12 stymulowanych yolkiiną zaobserwowano tendencję wzrostową wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP już po 15 minutach inkubacji (Rys. 7.9). Wzrost ten osiągnął poziom istotny statystycznie dopiero po 60 minutach inkubacji i wyniósł o 33 % więcej w stosunku do poziomu cAMP w komórkach kontrolnych niestymulowanych (NS).



**Rys.7.9. Wpływ yolkiiny na wewnątrzkomórkowy poziom cAMP w komórkach PC12.** Komórki PC12 traktowano yolkiiną (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) przez 15, 30 i 60 minut. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane adenozyną (Ade; 25  $\mu\text{M}$ ) przez 30 minut. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane (NS). Po zakończeniu stymulacji reakcję przerywano inkubując płytkę przez 5 minut w 99°C. Stężenie wewnątrzkomórkowego cAMP wyznaczono za pomocą testu ELISA. Wyniki przedstawiono jako średni wzrost stężenia cAMP (%) w komórkach stymulowanych względem stężenia cAMP w komórkach kontrolnych, niestymulowanych (NS), obliczonego dla 5 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta. \* $p < 0.05$  vs. kontrola (NS).

Głównym białkiem efektorowym cAMP jest kinaza PKA, która fosforyluje między innymi Ser133 czynnika CREB, co może prowadzić do wzrostu ekspresji *Bdnf* [246]. Wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP bierze udział w aktywacji kinazy PKA, poprzez umożliwienie odłączenia się jej jednostki katalitycznej od jednostki regulatorowej. Aktywność katalityczna PKA może być dodatkowo regulowana przez fosforylację, najbardziej powszechna jest fosforylacja reszty treoniny (Thr197) przez kinazy z rodziny PDK1 [247]. W kolejnym kroku sprawdzono czy zmiany w poziomie cAMP indukowane yolkiiną mają wpływ na zmianę poziomu fosforylacji kinazy PKA. W tym celu wykorzystano technikę Western Blotting z wykorzystaniem swoistych przeciwciał. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane NGF (100 ng/ml).

Zaobserwowano, że stymulacja komórek PC12 yolkiną spowodowała 1,3-krotny wzrost fosforylacji Thr197 kinazy PKA już po 15 minutach inkubacji, w porównaniu z poziomem fosforylacji w komórkach niestymulowanych (NS) (Rys. 7.10). Najwyższą aktywację zaobserwowano po 120 minutach stymulacji yolkiną (1,6-krotny wzrost).

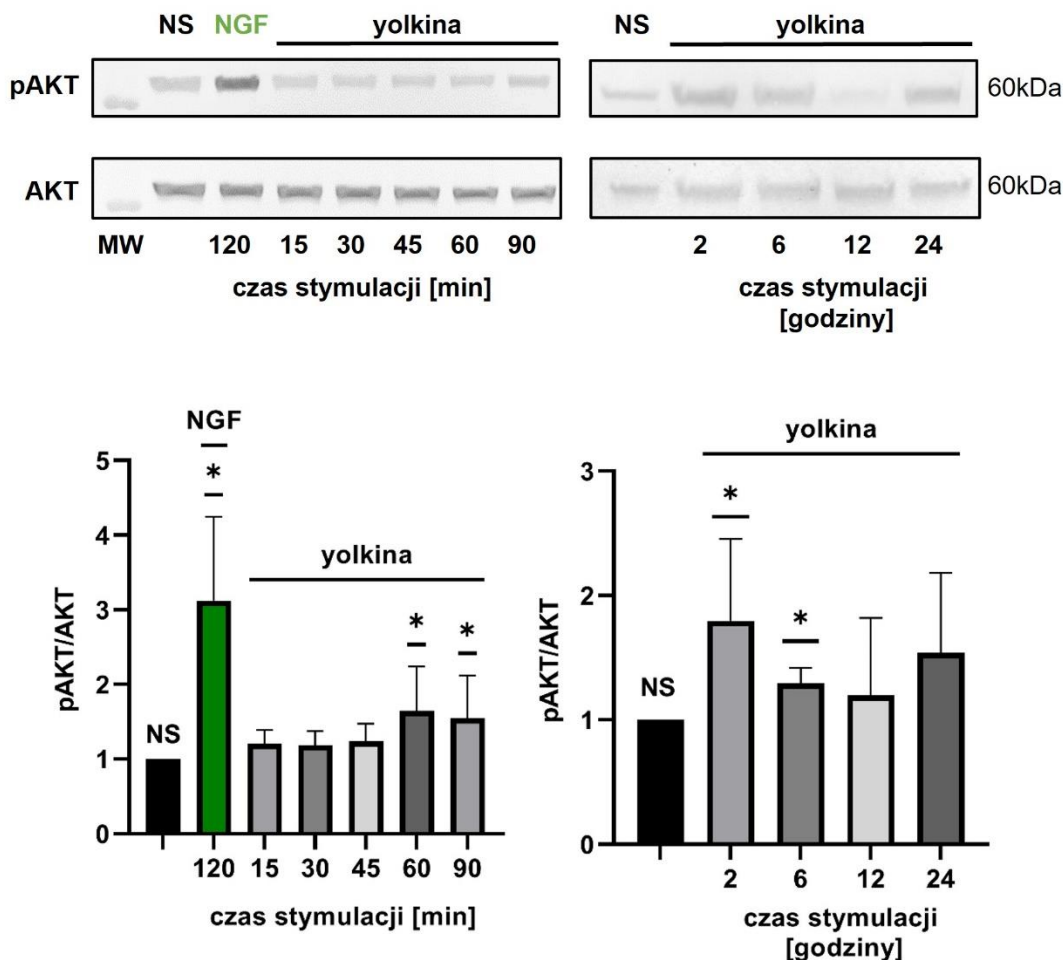


**Rys.7.10. Wpływ yolkiny na aktywację PKA w komórkach PC12.** Komórki stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i inkubowano w 37°C w czasie 15-120 minut. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane NGF (100 ng/ml) przez 120 minut. Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję PKA oraz p-PKA (Thr197) przeprowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko nim oraz króliczych przeciwciał drugorzędowych skonjugowanych z fosfatazą alkaliczną. Membranę wybarwiano z użyciem mieszaniny substratów (NBT i BCIP) i skanowano z użyciem skanera Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-rad), a następnie poddano analizie densytometrycznej za pomocą oprogramowania Image Lab 5.2. Wyniki przedstawiono jako zależność czasu stymulacji od średniej krotności sygnału uzyskanego dla próby kontrolnej (komórki niestymulowane, NS) wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 4 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta. \* $p < 0.05$  vs. kontrola (NS)

### 7.5.3. Wpływ yolkiny na aktywację szlaku kinaz PI3K/AKT

Kolejnym szlakiem sygnałowym odpowiedzialnym za regulację ekspresji *Bdnf* jest szlak zależny od aktywacji kinazy PI3K, której głównym efektem jest kinaza AKT. Za pomocą techniki Western Blotting z użyciem swoistych przeciwciał, zbadano zmiany w poziomie fosforylacji Ser473 kinazy AKT, w komórkach PC12 inkubowanych z yolkiną. Komórki inkubowano z yolkiną w czasie od 15 minut do 24 godzin. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane NGF (100 ng/ml), który aktywuje fosforylację Ser473 kinazy AKT.

Zaobserwowano istotny, 1,65-krotny wzrost fosforylacji Ser473 kinazy AKT po 60 minutach inkubacji z yolkiną w porównaniu z fosforylacją AKT obserwowaną w komórkach niestymulowanych (NS) (Rys.7.11). Aktywacja AKT utrzymywała się przez 6 godzin stymulacji yolkiną, osiągając maksimum po 2 godzinach (1,8-krotny wzrost). Ponadto, zgodnie z oczekiwaniem, w komórkach stymulowanych NGF obserwowano 3-krotny wzrost fosforylacji kinazy AKT, w porównaniu z komórkami niestymulowanymi.

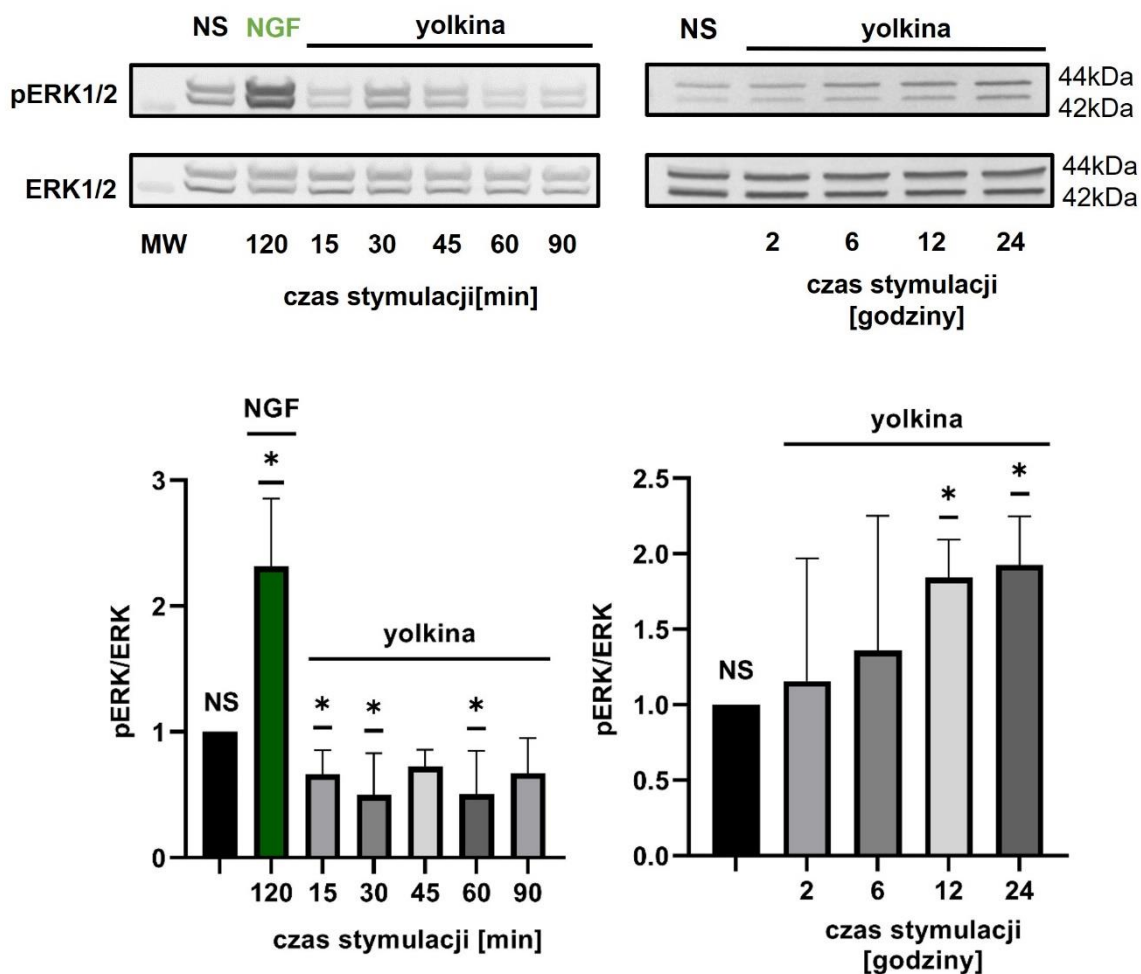


**Rys. 7.11. Wpływ yolkiny na aktywację AKT w komórkach PC12.** Komórki stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i inkubowano w 37°C w czasie 15-90 minut oraz 2-24 godziny. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane NGF (100 ng/ml) przez 120 minut. Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję AKT oraz p-AKT (Ser473) przeprowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko nim oraz króliczych przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z fosfatazą alkaliczną. Membranę wybarwiano z użyciem mieszaniny substratów (NBT i BCIP) i skanowano z użyciem skanera Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-rad), a następnie poddano analizie densytometrycznej za pomocą oprogramowania Image Lab 5.2. Wyniki przedstawiono jako zależność czasu stymulacji od średniej krotności sygnału uzyskanego dla próby kontrolnej (komórki niestymulowane, NS) wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 7 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta. \*p<0.05 vs. kontrola (NS)

#### 7.5.4. Wpływ yolkiny na aktywację kinaz ERK1/2

Kolejnym z rozważanych szlaków, który może być aktywowany przez yolkinę, prowadząc do aktywacji czynnika CREB, jest szlak zależny od kinaz ERK1/2. W tym celu komórki PC12 stymulowano yolkiną i zbadano jej wpływ na poziom fosforylacji Thr202 oraz Tyr204 w kinazach ERK1/2, stosując technikę Western Blotting. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane NGF (100 ng/ml).

Krótkotrwała stymulacja komórek PC12 yolkiną w czasie od 15 do 90 minut spowodowała obniżenie poziomu fosforylacji kinaz ERK1/2 o 30-50% w porównaniu z obserwowanym poziomem fosforylacji w komórkach niestymulowanych (NS) (Rys.7.12). Po 2 godzinach stymulacji yolkiną zaobserwowano tendencję wzrostową fosforylacji ERK1/2. Natomiast dopiero po 12 i 24 godzinach stymulacji komórek PC12 z yolkiną zauważono prawie 2-krotny wzrost fosforylacji.



**Rys. 7.12. Wpływ yolkiny na aktywację ERK1/2 w komórkach PC12.** Komórki stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i inkubowano w 37°C w czasie 15-90 minut oraz 2-24 godziny. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane NGF (100 ng/ml) przez 120 minut. Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję ERK1/2 oraz p-ERK1/2 (Thr202, Tyr204) przeprowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko nim oraz króliczych przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z fosfatazą alkaliczną. Membranę wybarwiano z użyciem mieszaniny substratów (NBT i BCIP) i skanowano z użyciem skanera Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-rad), a następnie poddano analizie densytometrycznej za pomocą oprogramowania Image Lab 5.2. Wyniki przedstawiono jako zależność czasu stymulacji od średniej krotności sygnału uzyskanego dla próby kontrolnej (komórki niestymulowane, NS) wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 5 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta. \*p<0.05 vs. kontrola (NS)

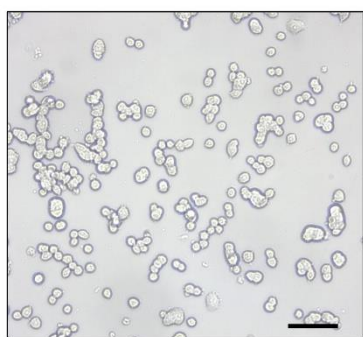
Podsumowując, uzyskane wyniki badań nad wpływem yolkiny na aktywację szlaków sygnałowych zaangażowanych w aktywację czynnika transkrypcyjnego CREB odpowiedzialnego za regulację ekspresji *Bdnf*, pozwoliły określić potencjalny mechanizm działania yolkiny. Wykazano, że yolkin nie powoduje zmian w wewnątrzkomórkowym poziomie jonów wapnia w komórkach PC12, aktywuje natomiast wewnątrzkomórkową syntezę cAMP oraz aktywację cAMP-zależnej kinazy PKA w komórkach PC12. Ponadto, yolkin jest zdolna do aktywacji szlaku kinaz PI3K/AKT. Nie wykazano jej udziału we wczesnej aktywacji kinaz ERK1/2. Co ciekawe, wzrost fosforylacji kinaz ERK1/2 zaobserwowano dopiero po 12 godzinach inkubacji komórek PC12 z yolkiną.

## 7.6. Wpływ yolki na morfologię komórek linii PC12

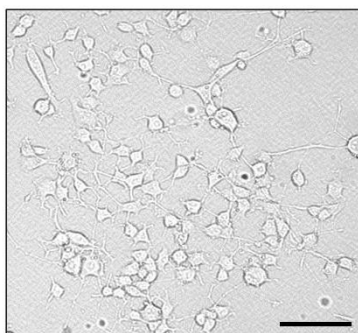
W kolejnym etapie badań sprawdzono wpływ yolki na proces tworzenia wypustek nerwowych z użyciem mikroskopu świetlnego. Powstanie wypustek nerwowych (aksonów i dendrytów) umożliwia tworzenie synaps i połączeń z innymi komórkami nerwowymi w procesie synaptogenezy. Komórki PC12 różnicowano yolkiną w kierunku neuronów przez 7 dni. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane neurotrofiną NGF, która w komórkach PC12 indukuje wzrost neurytów. Zmiany produktu ekspresji genu *Synapsyny I* na poziomie białka (marker synaptogenezy) zbadano za pomocą techniki Western Blotting.

Zgodnie z oczekiwaniem zaobserwowano, że komórki PC12 traktowane NGF utworzyły wypustki nerwowe widoczne w mikroskopie świetlnym z kontrastem fazowym (Rys.7.13 B). W przypadku stymulacji yolkiną nie zaobserwowano zmian w morfologii komórek PC12 i utworzeniu wypustek nerwowych (Rys.1.13 C). Ponadto, analiza poziomu markera białkowego synaptogenezy – Synapsyny I, wykazała brak wpływu yolki na jego ekspresję (Rys.7.13 D).

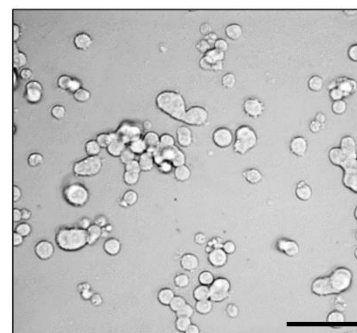
A. komórki niestymulowane



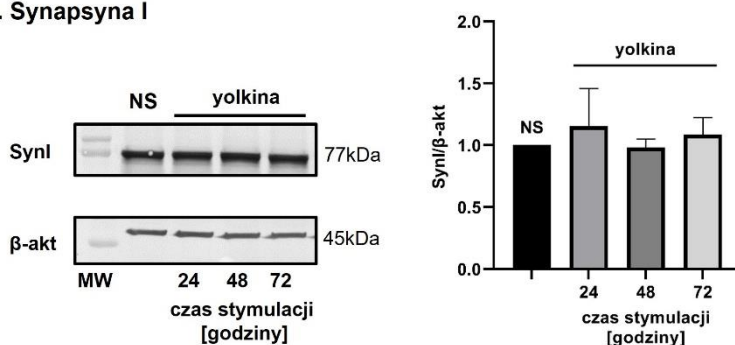
B. NGF (100 ng/ml)



C. yolki (100 µg/ml)

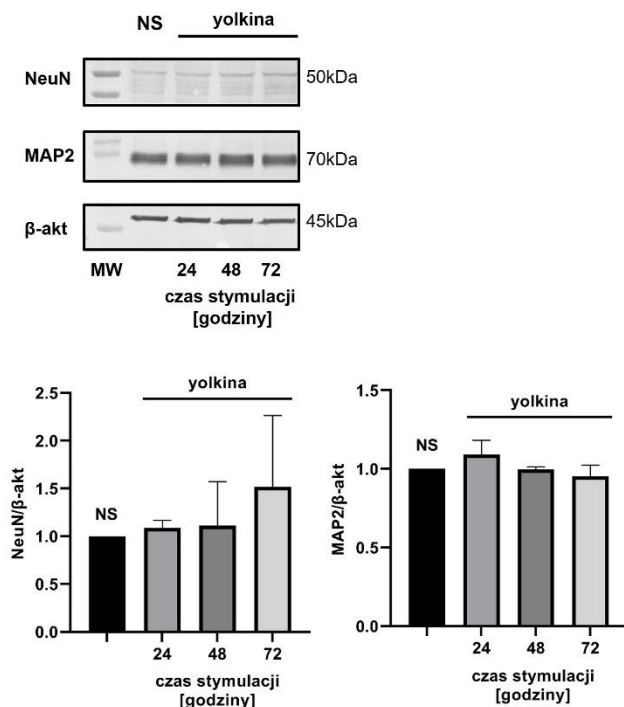


D. Synapsyna I



**Rys.7.13. Wpływ yolki na tworzenie wypustek nerwowych oraz synaps w komórkach PC12.** Komórki stymulowano NGF (100 ng/ml) (B) lub yolkiną (100 µg/ml) (C) przez 7 dni. Po tym czasie obserwowano zmiany w morfologii komórek w mikroskopie świetlnym (Leica DM IRE2) z kontrastem fazowym i sporządzono dokumentację fotograficzną. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane (NS) (A). Odcinek skalujący 50 µm. Badając wpływ yolki na produkt ekspresji genu *Synapsyny I* na poziomie białka, komórki PC12 stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i inkubowano w 37°C przez 24, 48, lub 72 godziny (D). Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję Synapsyny I oraz β-aktyny przeprowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko nim oraz króliczych przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z fosfatazą alkaliczną. Membranę wybarwiano z użyciem mieszaniny substratów (NBT i BCIP) i skanowano z użyciem skanera Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-rad), a następnie poddano analizie densytometrycznej za pomocą oprogramowania Image Lab 5.2. Wyniki przedstawiono jako zależność czasu stymulacji od średniej krotności sygnału uzyskanego dla próby kontrolnej (komórki niestymulowane, NS) wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 3 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta.

Sprawdzono również, czy yolkina wpływa na poziom białkowych produktów ekspresji genów *NeuN* (marker dojrzałych neuronów) oraz *MAP-2* (marker dendrytyczny), które są markerami neurogenezy. W tym celu zastosowano technikę Western Blotting. Komórki PC12 stymulowano yolkiną przez 24, 48 oraz 72 godziny. Nie wykazano istotnych zmian w poziomie białkowych produktów ekspresji badanych genów (Rys.7.14).



**Rys.7.14. Wpływ yolkiny na poziom białkowych produktów ekspresji genów *NeuN* oraz *MAP-2* w komórkach PC12.** Komórki PC12 stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i inkubowano w 37°C w czasie 24, 48, lub 72 godzin. Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję NeuN, MAP-2 oraz β-aktyny przeprowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko nim oraz króliczych przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z fosfatazą alkaliczną. Membranę wybarwiano z użyciem mieszaniny substratów (NBT i BCIP) i skanowano z użyciem skanera Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-rad), a następnie poddano analizie densytometrycznej za pomocą oprogramowania Image Lab 5.2. Wyniki przedstawiono jako zależność czasu stymulacji od średniej krotności sygnału uzyskanego dla próby kontrolnej (komórki niestymulowane, NS) wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 3 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta.

Z obserwacji wynika, że yolkina nie wpływa na proces powstawania wypustek nerwowych i synaps w komórkach PC12, pozostaje też bez wpływu na poziom białkowych produktów ekspresji genów związanych z neurogenezą.

## 7.7. Wpływ yolkiny na regulację stresu oksydacyjnego

Wraz z wiekiem, w wyniku działania wolnych rodników wzrasta liczba uszkodzonych makrocząsteczek, które wpływają na pogorszenie funkcjonowania organizmu. Mózg jest bardzo wrażliwym organem na stres oksydacyjny między innymi ze względu na intensywny metabolizm tlenowy, dużą zawartość lipidów, wysokie zapotrzebowanie na energię oraz słabą aktywność antyoksydacyjną [40]. Zatem rola stresu oksydacyjnego w procesie starzenia mózgu jest bardzo istotna. Wykazano, że substancje, które posiadają potencjalne właściwości neuroprotektoryjne mogą być również antyoksydantami [248]. Z tego względu w kolejnym etapie badań sprawdzono

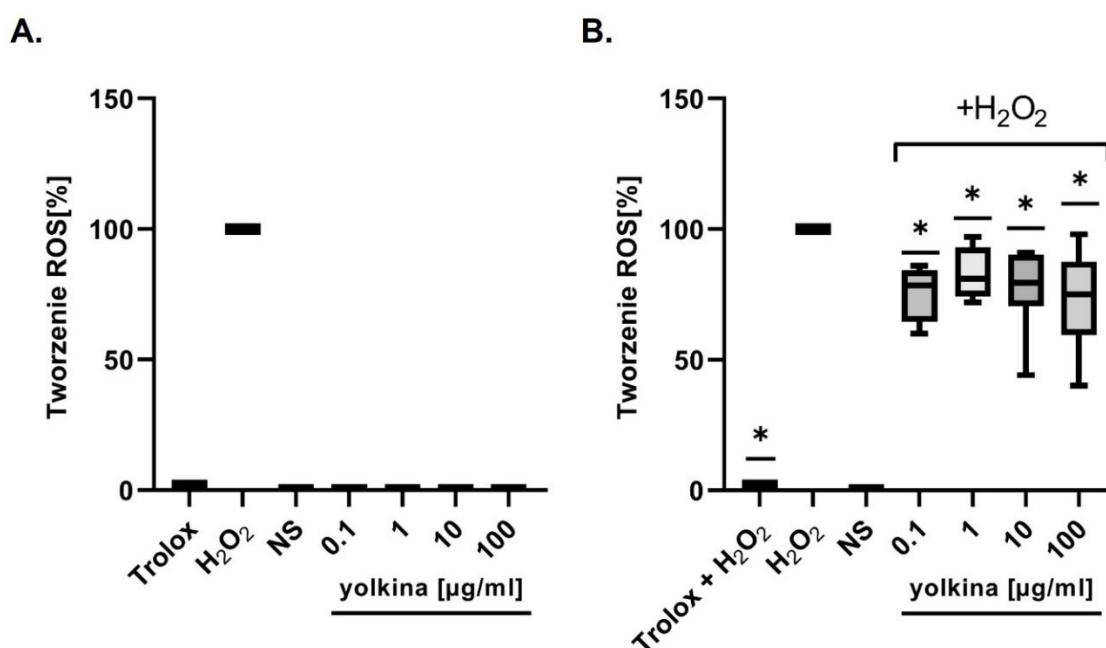


czy kompleks peptydowy yolkina posiada właściwości antyoksydacyjne oraz/lub czy jest zdolny do aktywacji systemu antyoksydacyjnego i obniżania poziomu wolnych rodników tlenowych.

### 7.7.1. Wpływ yolkina na wewnątrzkomórkowy poziom ROS w komórkach PC12

W celu określenia zdolności yolkina do hamowania indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach PC12, zbadano jej wpływ na wewnątrzkomórkowy poziom wolnych rodników tlenowych poprzez pomiar utleniania sondy dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH-DA).  $H_2O_2$  posiadający zdolność przenikania przez błonę komórkową stanowił zewnątrzkomórkowe źródło wolnych rodników. Jako kontrolę pozytywną użyto Troloxu, który jest pochodną witaminy E o silnym działaniu antyoksydacyjnym.

W pierwszym etapie badań zaobserwowano, że yolkina nie indukuje w komórkach PC12 zmian w wewnątrzkomórkowym poziomie ROS, ich poziom utrzymywał się na poziomie bliskim zera, analogicznie do komórek niestymulowanych (NS) (Rys.7.15 A). Następnie wykazano, że potraktowanie komórek PC12  $H_2O_2$  spowodowało wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu ROS, skutkującego istotnym wzrostem fluorescencji sondy DCF. Efektu tego nie obserwowano natomiast, kiedy  $H_2O_2$  podano komórkom wraz z Troloxem, co świadczy o szybkiej neutralizacji powstających ROS w komórce. W celu określenia regulatorowego wpływu yolkina na wewnątrzkomórkowy poziom ROS, komórki PC12 inkubowano z  $H_2O_2$  podanym jednocześnie z yolkiną. Zaobserwowano istotny spadek fluorescencji sondy DCF o 25%, 18%, 23% oraz 27% odpowiednio dla stężenia yolkina 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$  (Rys.7.15 B). Wyniki te sugerują, że kompleks yolkina jest zdolny do regulacji mechanizmów obrony antyoksydacyjnej.

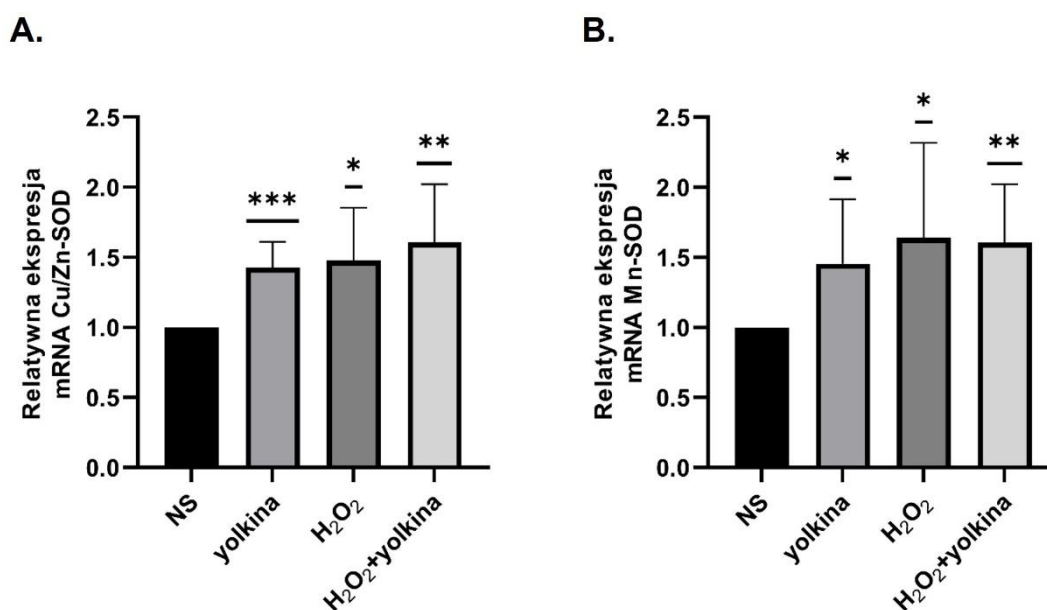


**Rys. 7.15 Wpływ yolkina na  $H_2O_2$ -zależną indukcję wewnątrzkomórkowej akumulacji ROS w komórkach PC12.** **A.** Komórki PC12 inkubowano z yolkiną (0.1-100  $\mu\text{g/ml}$ ), Troloxem (10  $\mu\text{M}$ ) lub  $H_2O_2$  (75  $\mu\text{M}$ ) przez 60 minut w 37°C przy 5%  $CO_2$ . Kontrolę pozytywną stanowił 75  $\mu\text{M}$   $H_2O_2$ . Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane (NS). **B.** Komórki PC12 inkubowano z yolkiną (0.1-100  $\mu\text{g/ml}$ ) podaną równocześnie z 75  $\mu\text{M}$   $H_2O_2$  przez 60 minut w 37°C przy 5%  $CO_2$ . Kontrolę pozytywną stanowił 75  $\mu\text{M}$   $H_2O_2$ . Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane (NS). Próbę referencyjną stanowiły komórki traktowane 75  $\mu\text{M}$   $H_2O_2$  w obecności 10  $\mu\text{M}$  Troloxu. Intensywność fluorescencji mierzono przy wzbudzeniu/emisji przy 485 nm/527 nm w czytniku Enspire™ 2300 (Perkin Elmer, Waltham, USA). Obserwowane zmiany wyrażono w % względem kontroli pozytywnej ( $H_2O_2$ ), dla której odczytaną fluorescencję określono jako 100%. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią wraz z wartościami min-max, obliczonymi dla 4 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t-Studenta. \* $p < 0.05$  vs.  $H_2O$

### 7.7.2. Wpływ yolki na ekspresję enzymów antyoksydacyjnych w komórkach PC12

Kluczową rolę w obronie przed stresem oksydacyjnym stanowią enzymy antyoksydacyjne takie jak dysmutaza ponadtlenkowa cytozolowa (Cu/Zn-SOD) oraz mitochondrialna (Mn-SOD) [36]. Z tego względu, stosując metodę ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (real-time PCR), zmierzono wpływ yolki na poziom ekspresji mRNA genów kodujących białka związane z obroną antyoksydacyjną w komórkach PC12. Kontrolę pozytywną stanowił 75  $\mu\text{M}$  roztwór  $\text{H}_2\text{O}_2$ , który jest aktywatorem stresu oksydacyjnego w komórkach.

Wykazano, że w komórkach PC12 traktowanych 75  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  – będącym bezpośrednim źródłem ROS oraz induktorem stresu oksydacyjnego zachodzi wzrost ekspresji *Cu/Zn-SOD* (1,5-krotny) oraz *Mn-SOD* (1,6-krotny), co świadczy o uruchomieniu w komórkach systemu obrony antyoksydacyjnej (Rys.7.16). Sam kompleks yolki również powodował prawie 1,5-krotny wzrost poziomu ekspresji mRNA dysmutazy ponadtlenkowej, zarówno formy cytozolowej jak i mitochondrialnej, mimo, iż nie jest induktorem stresu oksydacyjnego. W celu zbadania regulatorowego działania yolki, komórki PC12 inkubowano z  $\text{H}_2\text{O}_2$  podanym jednocześnie z yolką. Wykazano, że yolka podawana komórkom wraz z  $\text{H}_2\text{O}_2$  powoduje 1,6-krotny wzrost ekspresji mRNA *Cu/Zn-SOD* oraz *Mn-SOD* w porównaniu z poziomem ekspresji w komórkach niestymulowanych (NS). Nie zauważono istotnych różnic między stymulacją komórek PC12 samym  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a  $\text{H}_2\text{O}_2$  podanym z yolką.



**Rys.7.16 Wpływ yolki na ekspresję mRNA *Cu/Zn-SOD* (A) oraz *Mn-SOD* (B) w komórkach PC12.** Komórki PC12 stymulowano yolką (100  $\mu\text{g/ml}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (75  $\mu\text{M}$ ) oraz yolką (100  $\mu\text{g/ml}$ ) i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (75  $\mu\text{M}$ ) podanymi jednocześnie przez 60 minut. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane (NS). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, które poddano odwrotnej transkrypcji i przeprowadzono reakcję real-time PCR. Analizę ekspresji badanych genów prowadzono z zastosowaniem metody  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  względem genu referencyjnego *Gapdh*. Wyniki przedstawiono jako średnią relatywną ekspresję mRNA *Cu-SOD* i *Mn-SOD* względem kontroli, wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 7 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t-Studenta. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0001$  vs. kontrola (NS)

### 7.7.3. Pomiar aktywności przeciwutleniającej yolki

Ocenę zdolności yolki do neutralizacji wolnych rodników przeprowadzono z użyciem roztworu stabilnego rodnika DPPH (rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowy). Aktywność przeciwutleniającą yolki określono za pomocą metody FRAP, która określa zdolność

redukowania stopnia utlenienia jonów żelaza Fe(III) do Fe(II). Natomiast zdolność yolkiny do chelatacji jonów żelaza zbadano używając roztworu FeCl<sub>2</sub> oraz ferrozyny.

Przeprowadzone badania wykazały, że kompleks peptydowy yolkina nie posiada aktywności przeciwutleniającej (Tabela 7.3). Yolkina nie posiada cech antyoksydanta: nie jest zdolna do usuwania rodnika DPPH oraz redukcji jonów Fe(III) do Fe(II) (FRAP). Zaobserwowana zdolność yolkiny do chelatacji jonów Fe(II), która wyniosła 1,396 [µg Fe<sup>2+</sup>] dla dawki 100 µg/ml, jest również bardzo niska i nie świadczy o potencjale antyoksydacyjnym yolkiny.

**Tabela 7.3. Aktywność przeciwutleniająca yolkiny.**

Stężenie yolkiny [µg/ml]	Aktywność wobec DPPH [µM Trolox <sub>eq</sub> ]	Zdolność chelatacji Fe(II) [µg Fe <sup>2+</sup> ]	Zdolność do redukcji Fe(III) do Fe(II) [µg Fe <sup>2+</sup> ]
0,1	0,005 ± 0,004	0 ± 0	0 ± 0
1	0,007 ± 0,001	0,157 ± 0,136	0 ± 0
10	0,006 ± 0,001	0,157 ± 0,272	0 ± 0
100	0 ± 0	1,396 ± 0,165	0,015 ± 0,007

## 7.8. Wpływ yolkiny na toksyczne działanie Aβ<sub>1-42</sub> w komórkach PC12

W warunkach fizjologicznych uwalniane są monomery białka amyloidu beta 1-42 (Aβ<sub>1-42</sub>), które nie wykazują działania toksycznego lecz neurotroficzne. Natomiast w warunkach patologicznych lub w wyniku starzenia, produkcja Aβ<sub>1-42</sub> wzrasta, a efektywność jego usuwania spada, co prowadzi do jego nadmiernej akumulacji i tworzenia toksycznych i nierozpuszczalnych agregatów [26]. Agregaty Aβ<sub>1-42</sub> gromadzą się w różnych regionach mózgu i stanowią kluczowy czynnik patologiczny prowadzący do degeneracji komórek nerwowych [49], [51]. W związku z tym celem kolejnych badań było sprawdzenie zdolności yolkiny do hamowania toksycznego wpływu Aβ<sub>1-42</sub> na komórki PC12.

### 7.8.1. Wpływ yolkiny na przeżywalność i morfologię komórek PC12 traktowanych Aβ<sub>1-42</sub>

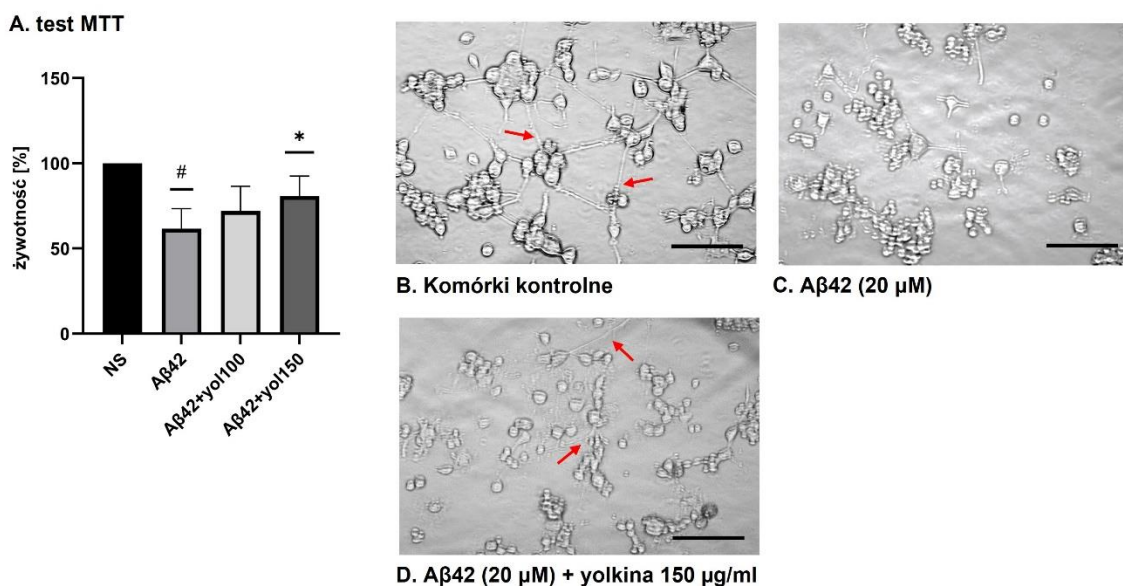
Celem badań było sprawdzenie, czy kompleks yolkina jest zdolny do ochrony przeżywalności komórek PC12 traktowanych toksycznym białkiem Aβ<sub>1-42</sub>. W celu określenia stopnia żywotności komórek użyto testu MTT.

Wyniki testu MTT wykazały, że po 24 godzinnej inkubacji, agregowany Aβ<sub>1-42</sub> (20 µM) obniżał żywotność komórek PC12 do 61% względem komórek kontrolnych, niestymulowanych (NS), dla których żywotność przyjęto jako 100% (Rys. 7.17A). Z kolei inkubacja komórek PC12 z agregowanym Aβ<sub>1-42</sub> podanym jednocześnie z yolkiną powodowała wzrost ich przeżywalności do 72% (dla yolkiny 100µg/ml) oraz 80% (dla yolkiny 150µg/ml).

W celu zbadania wpływu yolkiny na ochronę wypustek nerwowych komórki PC12 zróżnicowano do komórek nerwowych w obecności NGF w ciągu 5 dni. Następnie komórki potraktowano Aβ<sub>1-42</sub> (20 µM) w obecności i nieobecności yolkiny. Zmiany w morfologii komórek obserwowano w mikroskopie świetlnym z kontrastem fazowym.

Z obserwacji prowadzonych w mikroskopie świetlnym na zróżnicowanych komórkach PC12 wynika, że komórki traktowane agregowanym Aβ<sub>1-42</sub> utraciły utworzone przez siebie wypustki, a ich ciało komórkowe skurczyło się, tracąc wydłużony kształt (Rys. 7.17 C). Obecność yolkiny częściowo hamowała proces degeneracji wypustek nerwowych indukowany Aβ<sub>1-42</sub> (Rys. 7.17 D, zaznaczone czerwoną strzałką).

Podsumowując, uzyskane wyniki badań sugerują, że kompleks polipeptydowy yolkina może posiadać zdolność do ochrony komórek nerwowych przed toksycznym działaniem gromadzących się agregatów białka Aβ<sub>1-42</sub>.

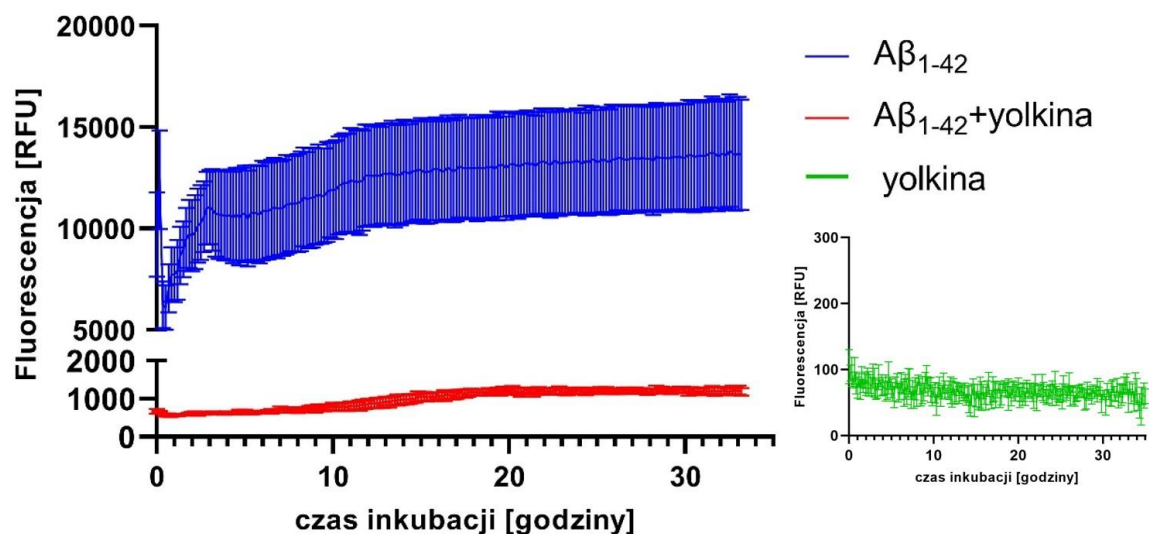


**Rys.7.17 Wpływ yolki na przeżywalność i morfologię komórek PC12.** (A). Komórki PC12 stymulowano agregowanym Aβ1-42 (20 μM) oraz yolkiną (100 μg/ml lub 150 μg/ml) w obecności Aβ1-42 (20 μM) i inkubowano przez 24 godziny w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Kontrolę negatywną stanowiły komórki kontrolne, niestymulowane. Próbę odnośnikową stanowiły komórki inkubowane z samym Aβ1-42. Przeżywalność komórek oceniano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość żywotności komórek wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 4 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta. #p<0.05 vs. kontrola (NS); \*p<0.05 vs. Aβ42 (B) Komórki PC12 różnicowano z użyciem NGF przez 5 dni w medium różnicującym obserwując tworzenie wypustek nerwowych (zaznaczone czerwoną strzałką). Po tym czasie komórki stymulowano agregowanym 20 μM Aβ1-42 (C) oraz yolkiną (150 μg/ml) w obecności 20 μM Aβ1-42 (D) i inkubowano przez 24 godziny w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Zmiany w morfologii komórek obserwowano w mikroskopie świetlnym (Leica DM IRE2) przy powiększeniu 20x, z kontrastem fazowym i sporządzono dokumentację fotograficzną. Odcinek skalujący 50 μm;

### 7.8.2. Wpływ yolki na agregację Aβ1-42

Wyniki uzyskane w punkcie 7.8.1 sugerują, że kompleks peptydowy yolki posiada zdolność do ochrony komórek nerwowych przed toksycznym działaniem gromadzących się agregatów białka Aβ1-42. Dlatego, w następnym etapie badań postanowiono sprawdzić czy yolki może hamować proces agregacji Aβ1-42. W tym celu wykorzystano dwie metody: metodę fluorescencyjną z użyciem barwnika Tioflawiny T (ThT) oraz technikę transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM).

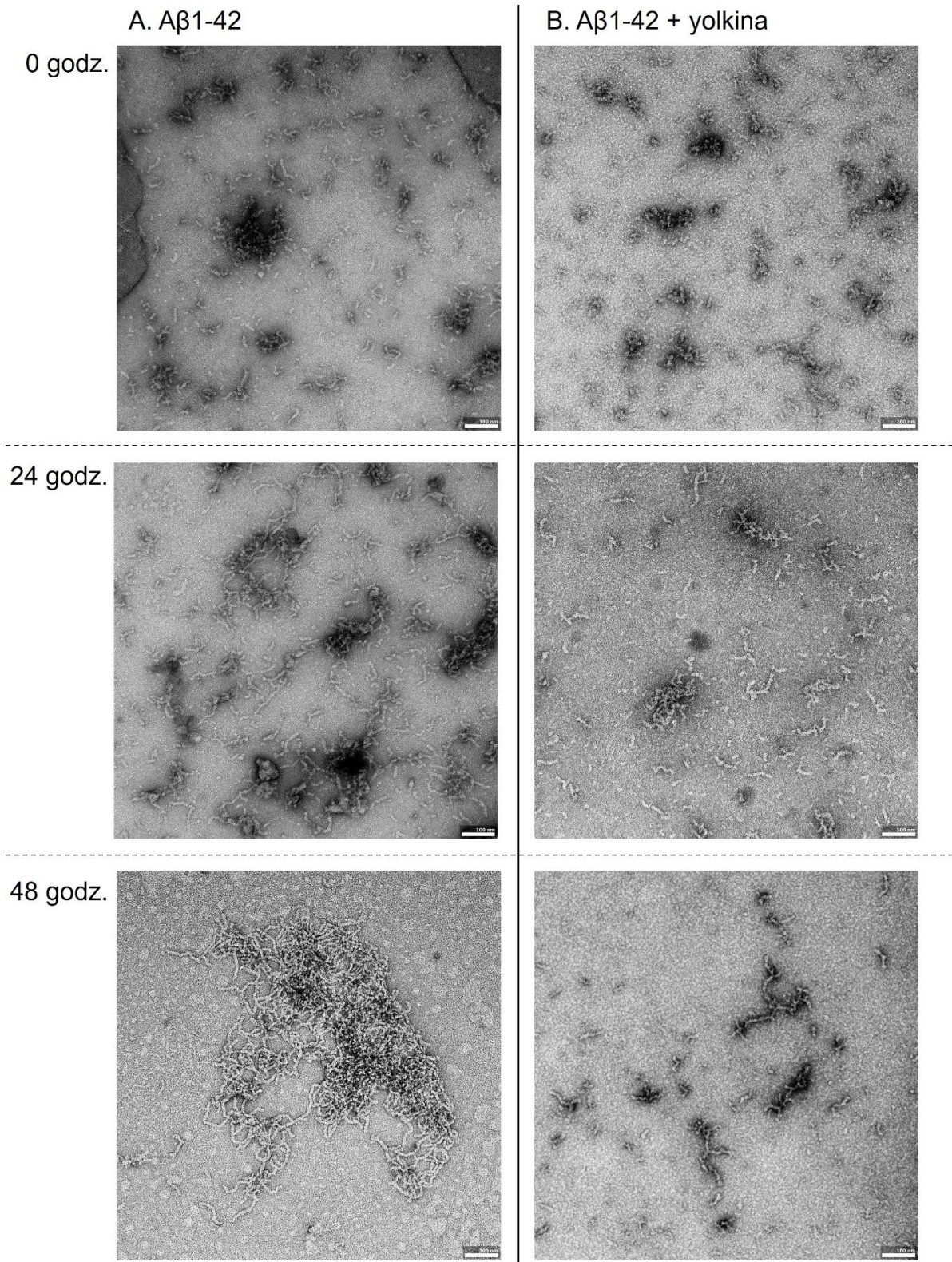
Roztwór ThT inkubowano z monomerami Aβ1-42 (20 μM) w obecności lub nieobecności yolki (100 μg/ml). Roztwór zawierający sam Aβ1-42 (20 μM) inkubowany z ThT wykazał wysoki poziom fluorescencji już na początku pomiarów ok. 5000 RFU. Powodem tak wysokiego poziomu fluorescencji w początkowych punktach pomiarowych może być bardzo szybki proces przyłączenia barwnika ThT do amyloidu, ale również trudność w całkowitym rozbiciu Aβ1-42 na monomery w etapie przygotowań. Następnie, poziom fluorescencji wzrósł logarytmicznie do wartości około 14000 RFU po 33 godzinach inkubacji amyloidu z ThT. Wzrost poziomu fluorescencji świadczy o powstaniu agregatów i przyłączaniu się do nich barwnika ThT (niebieska krzywa na wykresie) (Rys. 7.18). Natomiast inkubacja yolki (100 μg/ml) z Aβ1-42 (20 μM) spowodowała hamowanie procesu agregacji i utrzymanie fluorescencji na podobnym poziomie ok. 1000 RFU przez cały czas trwania eksperymentu (czerwona krzywa na wykresie). Dodatkowo, analiza sygnału fluorescencji pochodzącego od roztworu yolki inkubowanego z ThT potwierdziła, że sam kompleks yolki nie tworzy agregatów w roztworze (poziom fluorescencji utrzymywał się cały czas na bardzo niskim poziomie ok. 100 RFU - zielona krzywa na wykresie).



**Rys.7.18 Wpływ yolkiny na agregację A $\beta$ 1-42.** Proces agregacji A $\beta$ 1-42 (20  $\mu$ M) mierzono w obecności lub nieobecności yolkiny (100  $\mu$ g/ml) przy użyciu czarnych 96-dółkowych płytek do pomiaru fluorescencji. Roztwór ThT dodano do mieszaniny reakcyjnej tuż przed rozpoczęciem pomiaru. Zmiany w poziomie fluorescencji monitorowano przez 33 godziny w temperaturze 37°C w czytniku mikropłytek CLARIOstar® (BMG LabTech). Długość fali wzbudzenia i emisji ustawiono odpowiednio na 440 i 480 nm. Roztwór ThT użyto jako ślepej próby w celu wyeliminowania autofluorescencji. Wykresy przedstawiają średni poziom fluorescencji dla trzech próbek, mierzony w czasie, wraz z odchyleniem standardowym. Eksperyment wykonano trzykrotnie w trzech powtórzeniach roboczych dla każdej próby.

W kolejnym kroku postanowiono zobrazować oddziaływania yolkiny z agregującym A $\beta$ 1-42 wykorzystując technikę transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM).

Obrazowanie z użyciem techniki TEM pozwoliło zaobserwować wzrost agregacji A $\beta$ 1-42 w czasie 0-48 godzin inkubacji w 37°C (Rys.7.19 A). Natomiast inkubacja amyloidu w obecności yolkiny w 37°C spowodowała istotne zahamowanie tego procesu (Rys.7.19 B). Zarówno analiza agregacji A $\beta$ 1-42 z użyciem barwnika ThT jak i obrazowanie z użyciem techniki TEM sugerują, że yolkina może być zdolna do hamowania powstawania agregatów A $\beta$ 1-42.



**Rys. 7.19. Wpływ yolkiny na agregację A $\beta$ 1-42 (TEM).** Przeprowadzono proces agregacji A $\beta$ 1-42 (10  $\mu$ M) w obecności lub nieobecności yolkiny (100  $\mu$ g/ml) przez 24 i 48 godzin w temperaturze 37°C. Po upływie czasu inkubacji próbki utrwalono i umieszczono na siatkach miedzianych (400 Mesh) z folią formwarową i powłoką węglową. Przygotowane próbki kontrastowano z 2% octanem uranylu. Obrazowanie wykonano przy użyciu mikroskopu JEOL 1200 (JEOL Japan), który wykonał zdjęcia losowo wybranych przez siebie obszarów badanej próbki. Odcinek skalujący 100 nm.

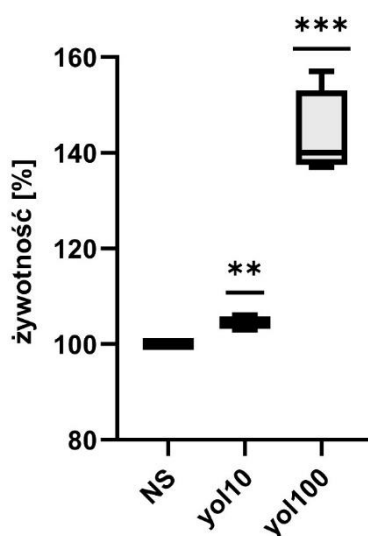
## 7.9. Wybór drugiego modelu badawczego – linia komórkowa H19-7

Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie molekularnych mechanizmów protekcyjnego działania kompleksu peptydowego yolkina w kontekście aktywacji szlaków sygnałowych prowadzących do ekspresji i wydzielania BDNF. W pierwszej części badań wykazano, że pod wpływem yolkiny, w komórkach linii PC12 zachodzi aktywacja cAMP-zależnej kinazy PKA oraz szlaku kinaz PI3K/AKT, zaangażowanych w aktywację czynnika transkrypcyjnego CREB odpowiedzialnego za regulację ekspresji *Bdnf*. W celu potwierdzenia wyników badań uzyskanych na komórkach linii PC12 wykorzystano nieśmiertelnione komórki prekursorowe hipokampa szczura - H19-7. Komórki H19-7, w przeciwieństwie do komórek PC12 posiadają receptor TrkB, który może wiązać się z m-BDNF i uruchamiać szlaki sygnałowe od niego zależne [239].

### 7.9.1. Ocena wpływu yolkiny na przeżywalność komórek H19-7

Wpływ yolkiny (10 i 100  $\mu\text{g/ml}$ ) na przeżywalność komórek linii H19-7 oznaczono za pomocą testu MTT. Kontrolę stanowiły komórki niestymulowane (NS), dla których przyjęto żywotność 100%. W teście MTT, służącym do analizy aktywności metabolicznej komórki, ilość zredukowanego barwnika jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki oraz do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek w populacji.

Uzyskane wyniki wykazały, że inkubacja komórek H19-7 z yolkiną przez 24 godziny nie wywoływała toksycznego efektu (Rys.7.20). Zaobserwowano natomiast istotny wzrost średniej aktywności metabolicznej komórek po stymulacji yolkiną o stężeniu 10  $\mu\text{g/ml}$  (104,5%) oraz 100  $\mu\text{g/ml}$  (144%), co wskazuje na korzystny wpływ yolkiny na wzrost ich przeżywalności w badanych warunkach.



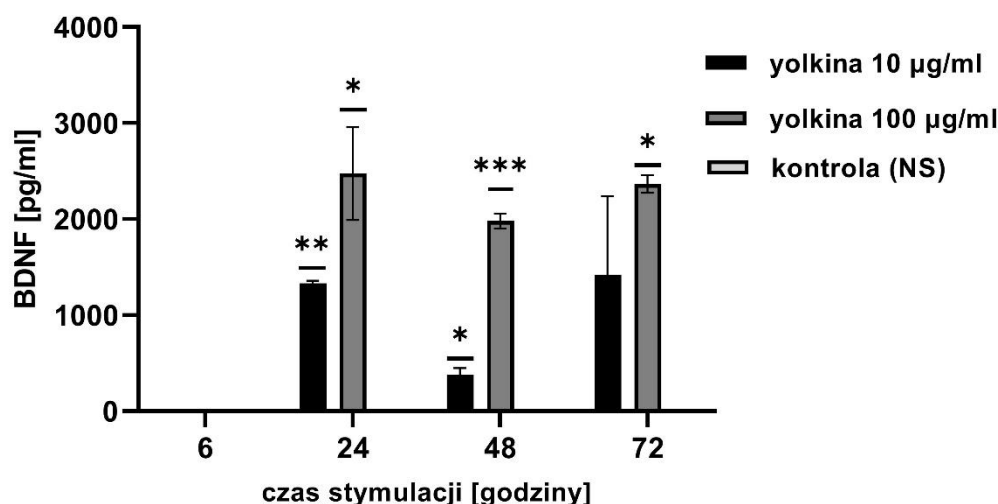
**Rys.7.20 Wpływ yolkiny na przeżywalność komórek H19-7.** Komórki H19-7 stymulowano yolkiną w stężeniu 10  $\mu\text{g/ml}$  (yol10) lub 100  $\mu\text{g/ml}$  (yol100) i inkubowano przez 24 godziny w 33°C, 5% CO<sub>2</sub>. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane (NS). Przeżywalność komórek oceniano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią wraz z wartościami min-max, obliczonymi dla 6 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t-Studenta. \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  vs. kontrola (NS)

## 7.10. Wpływ yolkiny na wydzielanie m-BDNF przez komórki H19-7

Stymulacja komórek linii PC12 yolkiną powodowała istotny wzrost produkcji i wydzielania m-BDNF (Punkt. 7.3). Ilość m-BDNF wydzielanego przez komórki H19-7 inkubowane z yolkiną (badaną w stężeniach 10 i 100  $\mu\text{g/ml}$ , analogicznie do stężeń użytych to traktowania

komórek linii PC12) oznaczono za pomocą komercyjnie dostępnego testu ELISA (BDNF Emax ImmunoAssay Systems; Promega).

Wykazano, że niestymulowane komórki (NS) H19-7 nie uwalniają mierzalnych ilości m-BDNF do supernatantu. W odpowiedzi na yolkinę, po 6 godzinach inkubacji również nie wykryto mierzalnych ilości tej neurotrofiny. Dopiero po 24 godzinach inkubacji z yolkiną komórki H19-7 uwalniały do supernatantu istotne ilości m-BDNF. Efekt ten zależny był od stężenia yolkiny i utrzymywał się przez 72 godziny inkubacji z kompleksem (Rys. 7.21).



**Rys. 7.21 Wpływ yolkiny na wydzielanie białka m-BDNF przez komórki H19-7.** Komórki H19-7 stymulowano yolkiną o stężeniu 10 µg/ml i 100 µg/ml przez 6, 24, 48 i 72 godziny w 33°C. Po tym czasie supernatanty zebrano i oznaczono w nich stężenie BDNF [pg/ml] za pomocą testu ELISA przy użyciu komercyjnego testu ELISA BDNF Emax ImmunoAssay Systems (Promega) zgodnie z zaleceniami producenta. Kontrolę ujemną stanowiły komórki niestymulowane. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią stężenia BDNF [pg/ml] wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 3 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t-Studenta. \*p<0.05, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001 vs. kontrola (NS)

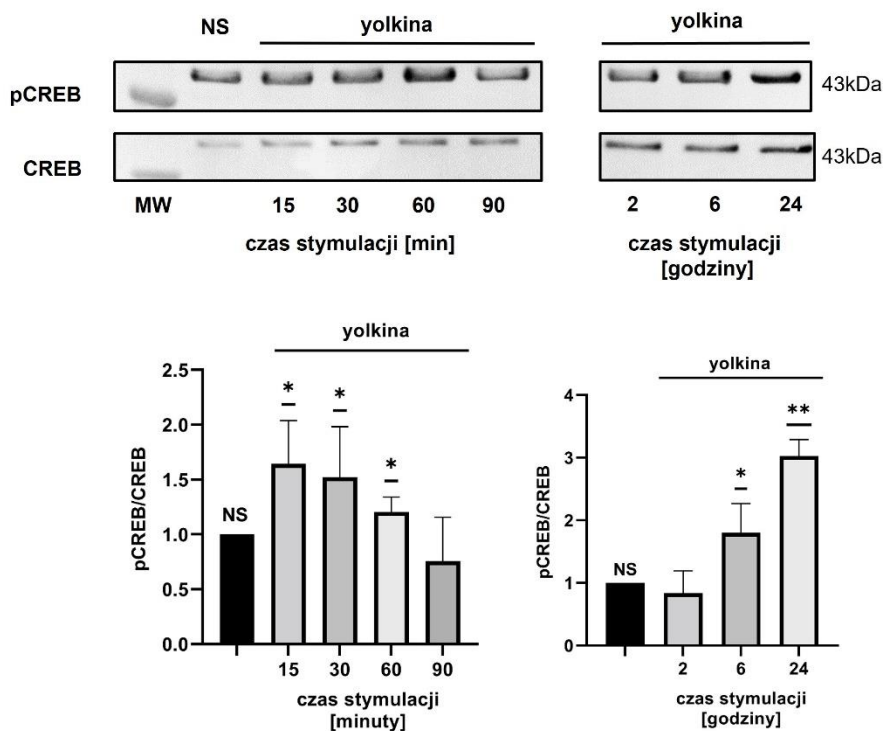
Podsumowując, brak toksycznego wpływu yolkiny (badanej w stężeniach 10 i 100 µg/ml) na przeżywalność komórek oraz jej istotny wpływ na wydzielanie m-BDNF przez komórki H19-7 potwierdziły wyniki badań uzyskane wcześniej na neuro-podobnej linii komórkowej PC12 (punkt 7.2.1 oraz 7.3.1) Ze względu na wyższą efektywność działania, w kolejnych eksperymentach stosowano yolkinę o stężeniu 100 µg/ml, analogicznie, jak w przypadku komórek linii PC12.

### 7.11. Wpływ yolkiny na aktywację czynnika transkrypcyjnego CREB w komórkach H19-7

Wykazany wzrost produkcji i wydzielania m-BDNF przez komórki PC12 traktowane yolkiną wiązał się z aktywacją czynnika transkrypcyjnego CREB. Komórki H19-7 stymulowane yolkiną również produkowały m-BDNF, dlatego postanowiono sprawdzić czy w komórkach tych zachodzi aktywacja czynnika CREB, odpowiedzialnego za ekspresję *Bdnf*. W tym celu zbadano zmiany w poziomie fosforylacji Ser133 w czynniku CREB techniką Western Blotting z użyciem swoistych przeciwciał. Zmiany w poziomie fosforylacji czynnika CREB oznaczano po inkubacji z yolkiną w krótkim (15-90min) oraz długim (2-24 godziny) czasie.

Wykazano, że yolkina indukowała w komórkach H19-7 krótkotrwałą fosforylację Ser133 już po 15 minutach inkubacji i utrzymywała ją do 60 minut. Zaobserwowano również powtórna, długotrwałą aktywację czynnika CREB po 6 godzinach traktowania yolkiną, utrzymującą się do 24 godzin w komórkach H19-7 (Rys.7.22).





**Rys.7.22. Wpływ yolkiny na aktywację czynnika CREB w komórkach H19-7.** Komórki stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i inkubowano w 33°C w czasie 15-90 minut oraz 2-24 godziny. Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję CREB oraz p-CREB (Ser133) przeprowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko nim oraz króliczych przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z fosfatazą alkaliczną. Membranę wybarwiano z użyciem mieszaniny substratów (NBT i BCIP) i skanowano z użyciem skanera Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-rad), a następnie poddano analizie densytometrycznej za pomocą oprogramowania Image Lab 5.2. Wyniki przedstawiono jako zależność czasu stymulacji od średniej krotności sygnału uzyskanego dla próby kontrolnej (komórki niestymulowane, NS) wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 6 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta. \*p<0.05 \*\*p<0.001 vs. kontrola (NS)

## 7.12. Wpływ yolkiny na aktywację szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za fosforylację czynnika transkrypcyjnego CREB w komórkach H19-7

Jak wykazano wcześniej, w komórkach linii PC12 yolkina nie powoduje zmian w wewnątrzkomórkowym poziomie jonów wapnia, aktywuje natomiast wewnątrzkomórkową syntezę cAMP oraz aktywację cAMP-zależnej kinazy PKA. Ponadto, yolkina była zdolna do aktywacji szlaku kinaz PI3K/AKT. Wykazano również jej udziału w długotrwałej aktywacji kinaz ERK1/2. Dlatego kolejnym krokiem było sprawdzenie czy w unieśmiertnionej linii komórek hipokampa H19-7 yolkina aktywuje te same szlaki sygnałowe.

### 7.12.1. Wpływ yolkiny na wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia

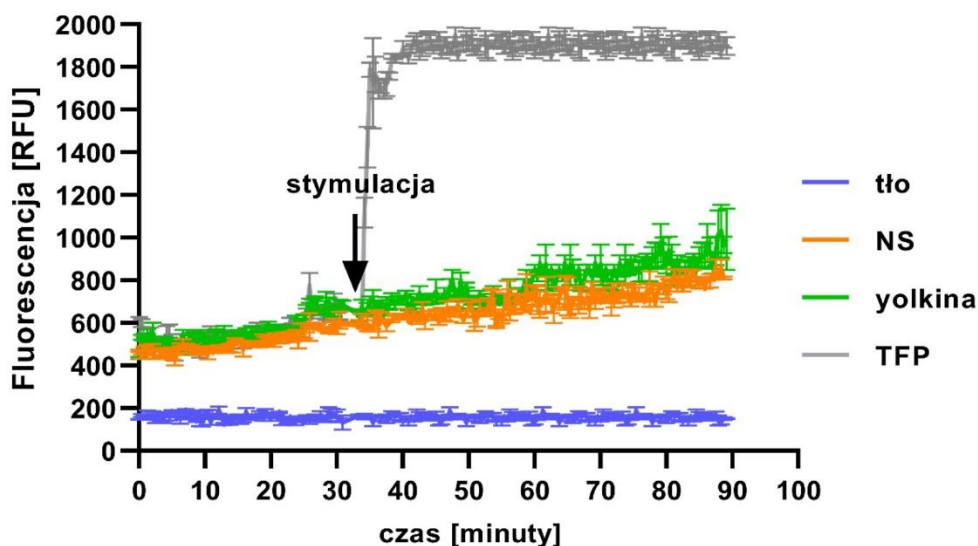
W pierwszym kroku zbadano wpływ yolkiny na zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia. Eksperymenty przeprowadzono w warunkach analogicznych użytych do badań na linii komórek PC12 (punkt 7.5.1). Komórki H19-7 stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i obserwowano zmiany fluorescencji w czasie.

Zaobserwowano, że sygnał fluorescencyjny pochodzący z komórek H19-7 traktowanych yolkiną (t=35 minut) zarówno w buforze reakcyjnym zawierającym jony wapnia (Rys. 7.23 A) jak i w środowisku pozbawionym jonów wapnia (Rys. 7.23 B), nie wykazał zmian w porównaniu do sygnału pochodzącego z komórek kontrolnych, niestymulowanych (NS). Inkubacja komórek

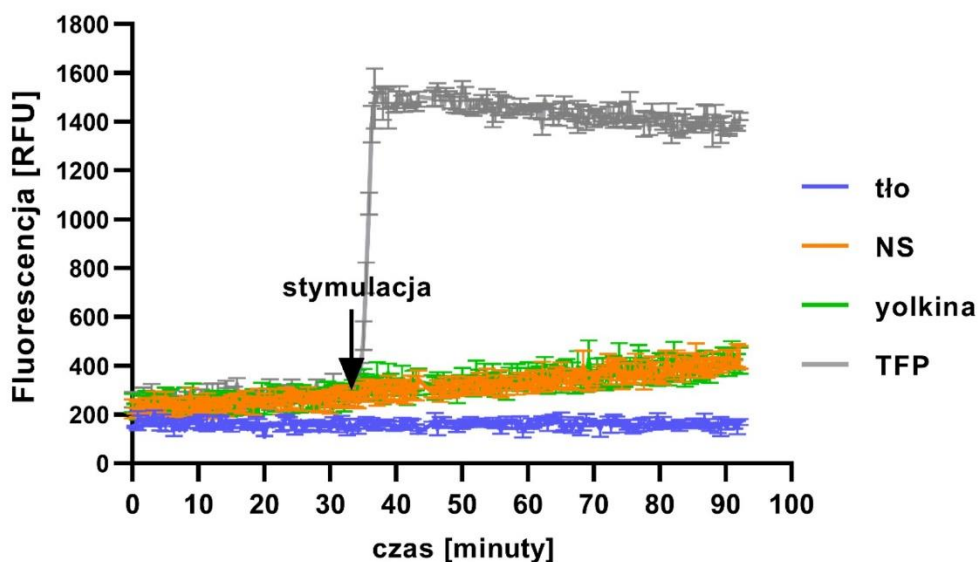
H19-7 z trifluoperazyną (TFP; 200  $\mu\text{M}$ ), użytej jako kontrola pozytywna w eksperymencie, powodowała istotny oraz nagły wzrost fluorescencji w czasie, co wskazuje na wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w komórkach.

Można zatem sugerować, że yolkina nie jest aktywatorem szlaków komórkowych zależnych od zmian wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia w komórkach H19-7. Uzyskane obserwacje potwierdziły wyniki otrzymane na linii komórkowej PC12.

#### A. Bufor z jonami wapnia



#### B. Bufor bez jonów wapnia

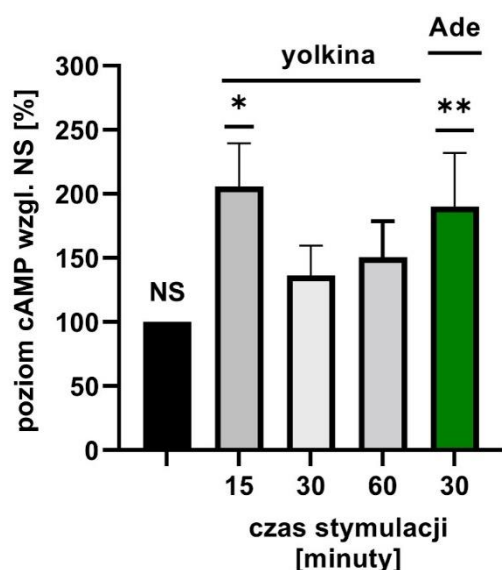


**Rys 7.23. Wpływ yolkina na zmianę wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia w komórkach H19-7.** Zawiesinę komórek H19-7 inkubowano z buforem reakcyjnym (zawierającym lub pozbawionym jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ) oraz z indykatorescencyjnym Fluo-4 AM, w ciemności przez 30 minut w 37°C w probówce typu Eppendorf. Po inkubacji, na 96-dółkową czarną płytkę naniesiono po 100  $\mu\text{l}$  inkubowanej zawiesiny komórek i rozpoczęto pomiar fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 494 nm i emisji 516 nm. Przez pierwszych 35 minut mierzono wartość fluorescencji w komórkach niestymulowanych (NS), aż do momentu jej stabilizacji. Następnie komórki stymulowano yolkiną (100  $\mu\text{g/ml}$ ) lub TFP (200  $\mu\text{M}$ ) i mierzono zmiany fluorescencji przez kolejne 60 minut. Pomiar fluorescencji w czasie wykonano w czytniku Synergy H4 Hybrid Reader (Biotek, Winooski, USA). Wyniki przedstawiono jako zależność czasu trwania eksperymentu od średniej wartości fluorescencji (RFU) wraz ze standardowym błędem pomiaru (SEM), zmierzonymi dla 3 niezależnych eksperymentów.

### 7.12.2. Wpływ yolkiny na wewnątrzkomórkowy poziom cAMP

Stymulacja komórek PC12 yolkiną powodowała istotny wzrost poziomu cAMP co skutkowało aktywacją cAMP-zależnej kinazy PKA. Dlatego, w kolejnym kroku zbadano czy w komórkach linii H19-7 yolkina ma to samo działanie. Jako kontrolę pozytywną użyto adenozyiny (25  $\mu$ M), która powoduje wzrost cAMP w komórkach nerwowych, w ścieżce zależnej od aktywacji receptorów GPC.

W komórkach H19-7 stymulowanych yolkiną zaobserwowano wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP o 106% w porównaniu z poziomem w komórkach kontrolnych (NS; 100%) po 15 minutach inkubacji, porównywalnie z kontrolną adenozyiną (Rys. 7.24). Reasumując, yolkina stymuluje komórki H19-7 do zwiększonej produkcji cAMP równie silnie, jak agonista receptora GPC – adenozyina.

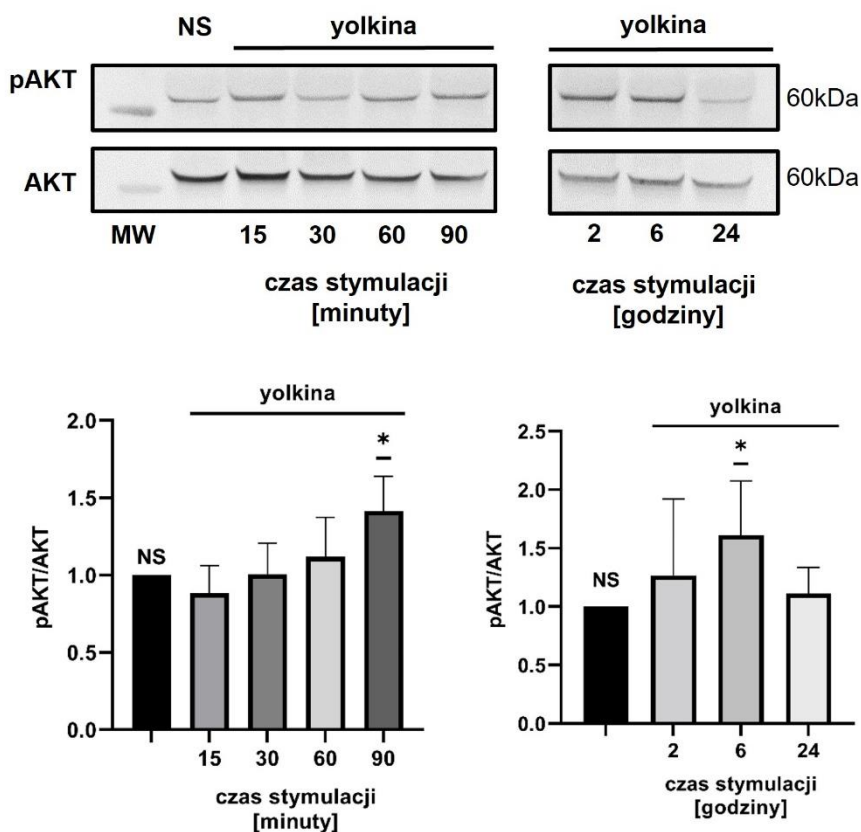


**Rys.7.24. Wpływ yolkiny na wewnątrzkomórkowy poziom cAMP w komórkach H19-7.** Komórki traktowano yolkiną (100  $\mu$ g/ml) przez 15, 30 i 60 minut. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane adenozyiną (Ade; 25  $\mu$ M) przez 30 minut. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane (NS). Po zakończeniu stymulacji reakcję przerywano inkubując płytkę przez 5 minut w 99°C. Stężenie wewnątrzkomórkowego cAMP wyznaczono za pomocą testu ELISA. Wyniki przedstawiono jako średni wzrost stężenia cAMP (%) w komórkach stymulowanych względem stężenia cAMP w komórkach kontrolnych, niestymulowanych (NS), obliczonymi dla 3 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta. \* $p < 0.05$  vs. kontrola (NS)

### 7.12.3. Wpływ yolkiny na aktywację szlaku zależnego od kinaz PI3K/AKT

Stymulacja komórek PC12 yolkiną powodowała istotny wzrost aktywacji kinaz PI3K/AKT (punkt 7.5.3). Efekt ten postanowiono sprawdzić w unieśmiertnionych komórkach hipokampa linii H19-7. Komórki H19-7 inkubowano z yolkiną (100  $\mu$ g/ml) i stosując technikę Western Blotting zbadano zmiany w poziomie fosforylacji Ser473 kinazy AKT po stymulacji krótkotrwałej (15-90 min) oraz długotrwałej (2-24 godziny).

Zaobserwowano 1,4-krotny wzrost fosforylacji Ser473 kinazy AKT w komórkach H19-7 pod wpływem yolkiny po 90 minutach inkubacji (Rys. 7.25). Ponowny wzrost fosforylacji AKT (1,6-krotny) zaobserwowano po 6 godzinach inkubacji, w odniesieniu do poziomu w komórkach kontrolnych niestymulowanych (NS).

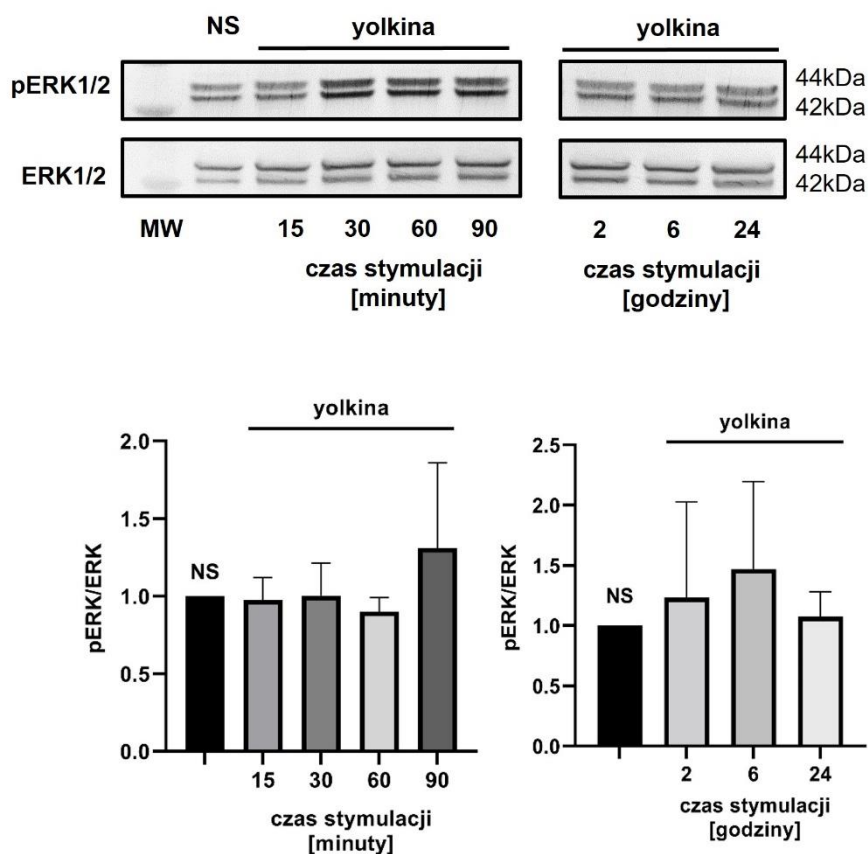


**Rys. 7.25. Wpływ yolkiny na aktywację AKT w komórkach H19-7.** Komórki stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i inkubowano w 33°C w czasie 15-90 minut oraz 2-24 godziny. Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję AKT oraz p-AKT (Ser473) przeprowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko nim oraz króliczych przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z fosfatazą alkaliczną. Membranę wybarwiano z użyciem mieszaniny substratów (NBT i BCIP) i skanowano z użyciem skanera Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-rad), a następnie poddano analizie densytometrycznej za pomocą oprogramowania Image Lab 5.2. Wyniki przedstawiono jako zależność czasu stymulacji od średniej krotności sygnału uzyskanego dla próby kontrolnej (komórki niestymulowane, NS) wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 6 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta. \* $p < 0.05$  vs. kontrola (NS)

#### 7.12.4. Wpływ yolkiny na aktywację kinaz ERK1/2

W komórkach neuro-podobnych linii PC12 nie wykazano zdolności yolkiny do krótkotrwałej aktywacji kinaz ERK1/2 (punkt 7.5.4). Zaobserwowano natomiast wzrost fosforylacji kinaz ERK1/2 dopiero po 12 godzinach inkubacji. Stąd, w kolejnym etapie przeprowadzono badania mające na celu sprawdzenie obserwowanego efektu yolkiny na modelu komórek linii H19-7. W tym celu komórki H19-7 stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i stosując technikę Western Blotting z użyciem swoistych przeciwciał zbadano jej wpływ na zmiany w poziomie fosforylacji Thr202 oraz Tyr204 w kinazach ERK1/2, w krótkich (15-90 min) oraz długich (2-24 godziny) czasach inkubacji.

Zaobserwowano, że komórki H19-7 stymulowane yolkiną nie wykazywały istotnych zmian w poziomie fosforylacji Thr202 oraz Tyr204 w kinazach ERK1/2, w porównaniu z komórkami niestymulowanymi (NS) (Rys.7.26).



**Rys. 7.26. Wpływ yolkiny na aktywację ERK1/2 w komórkach H19-7.** Komórki stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i inkubowano w 33°C w czasie 15-90 minut oraz 2-24 godziny. Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję ERK1/2 oraz p-ERK1/2 (Thr202, Tyr204) przeprowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko nim oraz króliczych przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z fosfatazą alkaliczną. Membranę wybarwiano z użyciem mieszaniny substratów (NBT i BCIP) i skanowano z użyciem skanera Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-rad), a następnie poddano analizie densytometrycznej za pomocą oprogramowania Image Lab 5.2. Wyniki przedstawiono jako zależność czasu stymulacji od średniej krotności sygnału uzyskanego dla próby kontrolnej (komórki niestymulowane, NS) wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 5 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta.

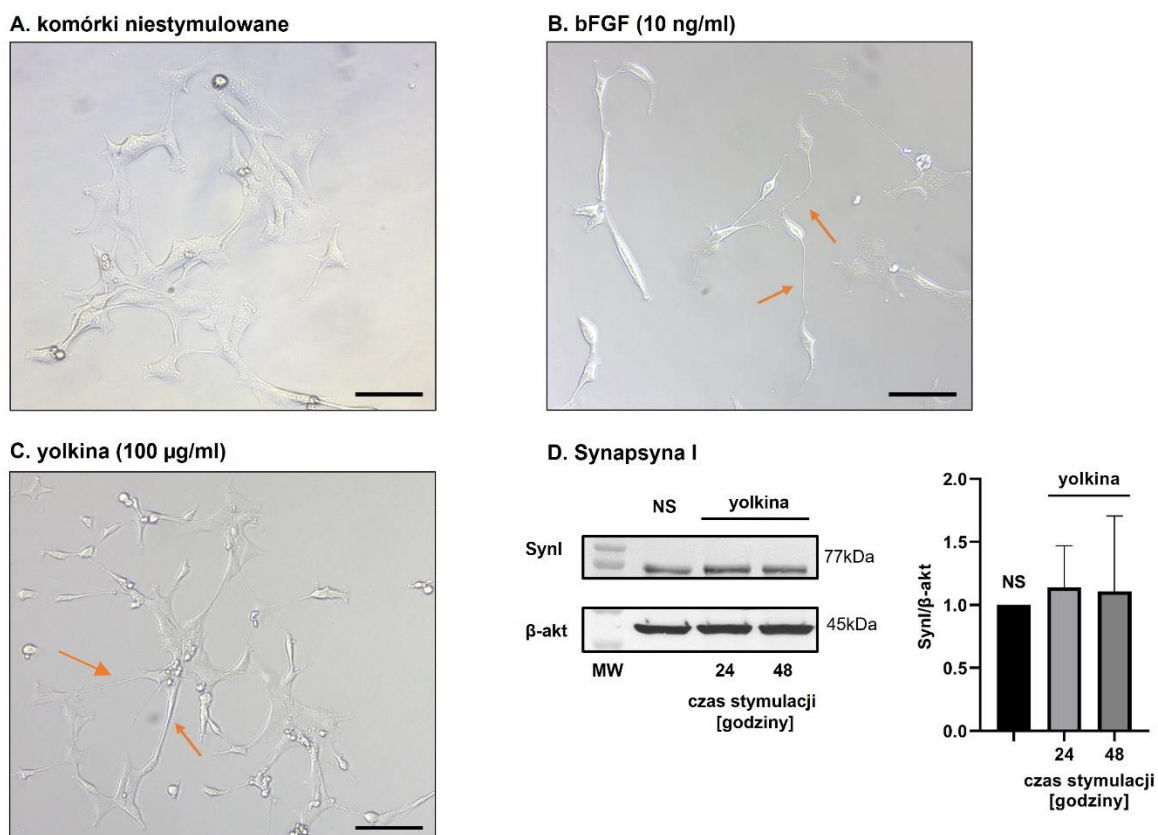
Podsumowując, wyniki uzyskane na modelu unieśmiertelnionych komórek prekursorowych hipokampa szczura H19-7 potwierdziły obserwowany na linii komórkowej PC12 wpływ yolkiny na produkcję i wydzielanie m-BDNF, aktywację czynnika transkrypcyjnego CREB oraz aktywację szlaków sygnałowych zaangażowanych w jego aktywację. W obu modelach komórkowych wykazano, że yolkina nie powoduje zmian w wewnątrzkomórkowym poziomie jonów wapnia, aktywuje natomiast wewnątrzkomórkową syntezę cAMP oraz szlak kinaz PI3K/AKT. Nie wykazano udziału yolkiny w krótkotrwałej aktywacji kinaz ERK1/2. Natomiast, w komórkach H19-7 nie wykazano wpływu yolkiny na długotrwałą aktywację kinaz ERK 1/2, obserwowaną po 12 godzinach inkubacji komórek PC12 z yolkiną.

### 7.13. Wpływ yolkiny na morfologię komórek linii H19-7

W kolejnym etapie badań sprawdzono wpływ yolkiny na tworzenie wypustek nerwowych w komórkach H19-7 z użyciem mikroskopu świetlnego z kontrastem fazowym. Powstanie wypustek umożliwia tworzenie synaps i połączeń z innymi komórkami nerwowymi w procesie synaptogenezy. Komórki H19-7 różnicowano yolkiną w kierunku dojrzałych neuronów hipokampa przez 48 godzin. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane bFGF, który w komórkach H19-7 aktywuje szlaki indukujące wzrost neurytów. Zmiany produktu ekspresji

genu *Synapsyny I* na poziomie białka (marker synaptogenezy) zbadano za pomocą techniki Western Blotting.

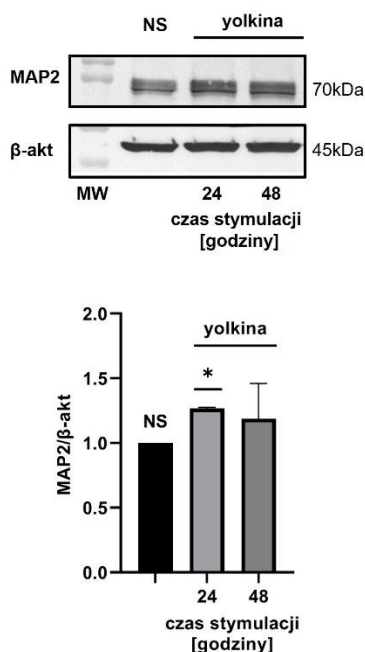
Komórki H19-7 pod wpływem bFGF tworzyły głównie długie wypustki nerwowe (zaznaczone strzałką w kolorze pomarańczowym) odpowiadające aksonom (Rys.7.27 B), w porównaniu z komórkami kontrolnymi, niestymulowanymi (Rys.7.27 A). Zaobserwowano również zmieniony kształt ciała komórkowego na bardziej wydłużony, wrzecionowaty, po stymulacji bFGF w porównaniu z kontrolą. W przypadku stymulacji yolkiną (100 µg/ml) zaobserwowano pojawienie się dodatkowych wypustek nerwowych tylko u pojedynczych komórek z populacji (Rys.7.27 C). Nie było to zjawisko obserwowane na szeroką skalę tak jak w przypadku komórek traktowanych bFGF. Natomiast wydaje się, że ciało komórkowe również uległo zmianie po stymulacji yolkiną i przyjęło bardziej wydłużony, wrzecionowaty kształt w porównaniu z komórkami niestymulowanymi. Analiza poziomu markera białkowego synaptogenezy – Synapsyny I, wykazała brak wpływu yolkiny na jego ekspresję (Rys.7.27 D).



**Rys.7.27. Wpływ yolkiny na tworzenie wypustek nerwowych oraz synaps w komórkach H19-7.** Komórki stymulowano bFGF (10 ng/ml) (B) lub yolkiną (100 µg/ml) (C) przez 48 godzin w medium różnicującym zawierającym suplement N2. Po tym czasie obserwowano zmiany w morfologii komórek w mikroskopie świetlnym (Leica DM IRE2) z kontrastem fazowym (20x) i sporządzono dokumentację fotograficzną. Powstałe wypustki zaznaczono strzałkami w kolorze pomarańczowym. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane. Odcinek skalujący 20 µm. (A). W przypadku synaptogenezy komórki H19-7 stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i inkubowano w 37°C w czasie 24 oraz 48 (D). Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję Synapsyny I oraz β-aktyny przeprowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko nim oraz króliczych przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z fosfatazą alkaliczną. Membranę wybarwiano z użyciem mieszaniny substratów (NBT i BCIP) i skanowano z użyciem skanera Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-rad), a następnie poddano analizie densytometrycznej za pomocą oprogramowania Image Lab 5.2. Wyniki przedstawiono jako zależność czasu stymulacji od średniej krotności sygnału uzyskanego dla próby kontrolnej (komórki niestymulowane, NS) wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 3 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta.

Sprawdzono również, czy yolkina wpływa na poziom białkowych produktów ekspresji genów *NeuN* (marker dojrzałych neuronów) oraz *MAP-2* (marker dendrytyczny), które są markerami neurogenезy. W tym celu zastosowano technikę Western Blotting. Komórki H19-7 stymulowano yolkiną przez 24 oraz 48 godzin.

W komórkach H19-7 nie udało się wykryć obecności białka NeuN za pomocą użytych dostępnych komercyjnie przeciwciał. Natomiast stymulacja komórek H19-7 yolkiną przez 24 godziny spowodowała istotny 1,3-krotny wzrost poziomu białka MAP-2 w porównaniu z komórkami niestymulowanymi (NS) (Rys. 7.28). Ze względu na słabą przeżywalność komórek H19-7 w medium zredukowanym w czasie dłuższym niż 48 godzin, nie prowadzono dłuższych stymulacji.



**Rys.7.28. Wpływ yolkiny na poziom białkowego produktu ekspresji genu *MAP-2* w komórkach H19-7.** Komórki stymulowano yolkiną (100 µg/ml) i inkubowano w 37°C w czasie 24 oraz 48 godzin. Kontrolę stanowiły komórki niestymulowane (NS). Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję MAP-2 oraz β-aktyny przeprowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko nim oraz króliczych przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z fosfatazą alkaliczną. Membranę wybarwiano z użyciem mieszaniny substratów (NBT i BCIP) i skanowano z użyciem skanera Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-rad), a następnie poddano analizie densytometrycznej za pomocą oprogramowania Image Lab 5.2. Wyniki przedstawiono jako zależność czasu stymulacji od średniej krotkości sygnału uzyskanego dla próby kontrolnej (komórki niestymulowane, NS) wraz z odchyleniem standardowym, obliczonymi dla 3 niezależnych eksperymentów. W analizie statystycznej wykorzystano parametryczny test t- Studenta. \*p<0.05 vs. kontrola (NS)

Reasumując, z obserwacji wynika, że yolkina wpływa na wzrost poziomu białka MAP-2 w komórkach H19-7, co może mieć związek z aktywacją wczesnych etapów procesu dendrytogenezy. Dodatkowo, w obrazie uzyskanym w mikroskopie świetlnym (Rys.7.27 C) zaobserwowano, że niektóre z obserwowanych komórek H19-7 stymulowanych yolkiną, posiadały zwiększoną liczbę wypustek nerwowych i wydłużony kształt ciała komórki, podobny do komórek stymulowanych bFGF. Prawdopodobne jest, że obserwowane zmiany w morfologii komórek H19-7 stymulowanych yolkiną mają związek z zaobserwowaną zwiększoną ekspresją MAP-2.

## 8. Dyskusja

Starzenie się jest złożonym, wieloczynnikowym oraz naturalnym procesem, który charakteryzuje się spadkiem czynności fizjologicznych i zdolności behawioralnych. Jest to proces nieodwracalny, a rosnąca średnia długość życia sprawia, że starzejące się społeczeństwo stanowi duży (wciąż rosnący) odsetek całej populacji. Dane dotyczące ludności starzejącej się (wiek powyżej 65 r.ż.) w Polsce pokazują, że udział tej grupy w całej populacji stanowi 18,8%. Dane światowe wskazują na podobne tendencje - w krajach wysoko rozwiniętych starzejące się społeczeństwo stanowi od około 20 do nawet 30% całej populacji [249]. Wraz ze wzrostem tego zjawiska pojawiła się potrzeba, aby ten nieodwracalny proces złagodzić i przeżyć go pomyślniej tj. bez chorób, niepełnosprawności, z zachowaniem wysokich funkcji poznawczych, umysłowych i fizycznych [250]. W aspekcie zachowania dobrej kondycji psychicznej i fizycznej istotnym organem jest mózg. Wraz z wiekiem obserwuje się zmniejszenie objętości tkanki mózgu, co ma związek nie tylko z obumieraniem komórek nerwowych, ale również z ich degeneracją, zmniejszeniem liczby rozgałęzień oraz kolców dendrytycznych [14], [17], [18]. Najbardziej widoczne zmiany obserwuje się w korze przedczołowej oraz hipokampie [19], [20]. Obserwowane w mózgu objawy starzenia obejmują m.in. zmiany w poziomie ekspresji i wydzielania czynników neurotroficznych [27], spadek ekspresji białek synaptycznych [23], regresję dendrytyczną w neuronach piramidalnych [24], tworzenie się złogów amyloidowych [26]. Nadmierna akumulacja uszkodzonych makrocząsteczek powoduje przekształcenie normalnego procesu starzenia się w proces neurodegeneracyjny [29].

Bardzo ważnym elementem ochrony zdrowia stała się profilaktyka zdrowotna, która jest w stanie częściowo zapobiec lub opóźnić rozwój chorób, a ponadto chroni organizm przed potencjalnie niebezpiecznymi czynnikami. Jednym z działań prozdrowotnych jest stosowanie nutraceutyków, które są naturalnymi substancjami biologicznie aktywnymi, pozyskiwanymi m.in. z roślin, owoców morza, produktów pszczelich, siary lub jaj. Nutraceutyki mogą korzystnie wpłynąć na organizm poprzez modyfikowanie procesów fizjologicznych lub metabolicznych, a ich stosowanie wpływa pozytywnie na opóźnianie procesów starzenia się organizmu [206]–[208].

Jednym z bardzo dobrych źródeł nutraceutyków są ptasie jaja, które w swoim składzie zawierają wiele cennych substancji, niezbędnych do wzrostu i ochrony rozwijającego się zarodka [206], [213]. Dekadę temu odkryto, że IgY wyizolowanej z żółtka jaja kurzego towarzyszy aktywna immunologicznie frakcja polipeptydowa o masie cząsteczkowej 1-35 kDa, którą nazwano yolkiną [219], [220]. Analiza sekwencji aminokwasowej *N*-końcowego fragmentu yolkiny wykazała homologię do *C*-końcowego fragmentu witellogeniny II. W ciągu ostatniej dekady, odkąd odkryto w żółtku kurzych jaj kompleks peptydowy yolkina, udało się wykazać wiele jego właściwości mających korzystny wpływ na organizm. Immunoregulatorowa aktywność yolkiny została dosyć dobrze poznana i scharakteryzowana [219], [220], [230], [231]

### I. Kompleks peptydowy yolkina jest stabilną pochodną witellogeniny I i II

Do tej pory wykazano, że kompleks yolkina składa się z peptydów o masie cząsteczkowej rzędu 1-35 kDa, które są bogate w aminokwasy kwasowe Asp/Asn oraz Glu/Gln, i ubogie w metioninę. Dodatkowo, wiadomo, że peptydy yolkiny o masie większej niż 16 kDa są glikoproteinami, a ich sekwencja aminokwasowa odpowiada sekwencji witellogeniny II, rozpoczynając od pozycji alaniny 1572 znajdującej się w *C*-końcowej domenie YGP40. Natomiast mniejsze peptydy o masie od 4 do 12 kDa charakteryzują się brakiem reszt cukrowych, a ich *N*-koniec odpowiada pozycji metioniny 1732, która również leży w obrębie *C*-końcowej domeny YGP40 witellogeniny II [220]. Badania w niniejszej pracy rozpoczęto od charakterystyki



preparatu yolkina użytego następnie w eksperymentach. Rozdział SDS-PAGE roztworu yolkiny wykazał przeważającą obecność peptydów o masie cząsteczkowej ok. 37 kDa, a także w małej ilości peptydy o masie cząsteczkowej >37 kDa oraz peptydy mieszczące się w zakresie masy 25-37 kDa (Rys. 7.1). Na żelu widoczne były również niewielkie ilości peptydów <20kDa. Wcześniejsze badania również wykazały, że w czterech odrębnie izolowanych preparatach yolkiny zaobserwowano obecność przeważającej ilości peptydów o masie około 20-25 kDa, lecz peptydy o większej masie (35 kDa) były widoczne jedynie w przypadku jednego preparatu [220]. Zaobserwowane różnice mogą wynikać z różnych źródeł pozyskiwania jaj. Mimo, iż w obu przypadkach były to jaja kurze, to sposób żywienia oraz hodowli kur może się znacząco różnić. Wcześniejsze preparaty yolkiny izolowane były z żółtek jaj pochodzących od kur zielononózek karmionych wysoce wyselekcjonowaną karmą bogatą m.in. w olej lniany i glony. Yolkiną wyizolowaną do badań w niniejszej pracy izolowana była z jaj kur z wolnego wybiegu, komercyjnie dostępnych. Obecność tych peptydów może również świadczyć o różnej aktywności enzymów proteolitycznych. Witellogenina II, która jest potencjalnym prekursorem peptydów yolkinowych, w wyniku trawienia katepsyną D uwalnia z łańcucha peptydowego glikoproteinę YGP40 (40 kDa), której C-koniec stanowi źródło peptydów wchodzących w skład kompleksu yolkina [251]. YGP40 może być hydrolizowana przez katepsynę D w większym lub mniejszym stopniu, i stąd na żelu mogą być widoczne pewne różnice w obecności peptydów o różnej masie. Analiza aktywności enzymatycznych katepsyn B, D i L pochodzących z jaj, w różnych klasach oocytów, wykazała, że aktywność ta zmienia się w zależności od etapu dojrzewania oocytu [252].

Pierwotna analiza sekwencji aminokwasowej yolkiny z zastosowaniem techniki Edmana wykazała, że N-koniec peptydów yolkiny jest homologiczny z C-końcową sekwencją witellogeniny II [220]. Przeprowadzona analiza peptydów yolkiny za pomocą nowoczesnej techniki spektrometrii mas potwierdziła uzyskane wcześniej wyniki mówiące o homologii sekwencji aminokwasowej peptydów yolkiny do sekwencji witellogeniny II (Tab. 7.2). Wykazano dodatkowo homologię do sekwencji aminokwasowej witellogeniny I. W obu przypadkach w badaniach uzyskano wysoki „score”, co świadczy o bardzo dobrym dopasowaniu wyszukiwanych peptydów w bazie Mascot. Co ciekawe, analiza z użyciem MS wykazała również obecność peptydów homologicznych do sekwencji aminokwasowej owoalbuminy, może być to zanieczyszczenie powstałe w procesie rozdzielania żółtka i białka kurzego na początkowym etapie izolacji.

Istotnym było również sprawdzenie stabilności preparatu yolkina podczas przechowywania. Analiza porównawcza preparatów yolkiny rozpuszczonych w PBS oraz liofolizatu, przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych w czasie nie wykazała znaczących różnic w ilości i intensywności prążków na żelu (Rys.7.2). Jedynie w przypadku dłuższego przechowywania (-20°C, 1,5 roku) zwiększyła się ilość peptydów o masie ok. 20 i 15 kDa, co świadczy o słabnącej stabilności kompleksu peptydowego przechowywanego w takich warunkach. Może to wynikać z obecności soli pozostałej po oczyszczeniu yolkiny w roztworze, która w wyniku dłuższego przechowywania kompleksu peptydowego wpływa osłabiająco na jego stabilność. Uzyskany wynik świadczy o tym, że kompleks yolkiny jest stabilny i może być bezpiecznie przechowywany krótkoterminowo w 4°C i -20°C oraz dosyć dobrze znosi przechowywanie długoterminowe w -20°C. Natomiast ocena stabilności termicznej, z wykorzystaniem platformy Prometheus NT.48, czterech niezależnie wyizolowanych preparatów yolkiny, wykazała, że preparaty te mają porównywalny profil rozkładowania, z pierwszą temperaturą topnienia w zakresie 46-48°C i drugą w 72-73°C (Rys. 7.3). Występowanie dwóch temperatur topnienia w preparacie yolkina może świadczyć o istnieniu dwóch grup białek, które w swoim obrębie posiadają podobne właściwości.

## II. Kompleks peptydowy yolkina aktywuje szlaki prowadzące do zwiększonej produkcji BDNF

Doniesienia literaturowe wskazują, że białka o właściwościach immunoregulatorowych mogą również odgrywać istotną rolę w ochronie i regulacji funkcji centralnego układu nerwowego [234], [235]. W badaniach na myszach z eksperymentalnym modelem choroby Alzheimera wykazano, że myszy otrzymujące preparat yolkiny doustnie wykazują lepsze wyniki testów behawioralnych, oceniających ich zdolność do zapamiętywania i uczenia się [237]. Kolejne badania sprawdzające wpływ yolkiny na funkcje poznawcze starzejących się szczurów wykazały, że yolkina zwiększa ich aktywność lokomotoryczną oraz znacząco poprawia ich pamięć przestrzenną i epizodyczną [238]. Przeprowadzone badania wykazały zatem korzystny wpływ yolkiny na poprawę funkcji pamięciowych i poznawczych u zwierząt. Stąd, ważnym celem kolejnych badań stało się wyjaśnienie molekularnego mechanizmu działania yolkiny w układzie nerwowym.

Głównym celem pracy doktorskiej było zbadanie molekularnego mechanizmu pro-kognitywnego działania preparatu peptydowego yolkina. Wiele badań wskazuje na to, iż neuroprotektcyjne oraz pro-kognitywne właściwości substancji wspierających układ nerwowy wiążą się z aktywacją szlaków prowadzących do zwiększonej ekspresji i wydzielania neurotrofin. Jednym z istotnych czynników neurotroficznymi, pełniącym ważną rolę w rozwoju i funkcjonowaniu CUN, w tym w procesach uczenia się i tworzenia pamięci, jest neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego – BDNF [91]. W niniejszej pracy zbadano wpływ yolkiny na produkcję i wydzielanie czynnika BDNF oraz aktywację szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za regulację tego procesu. W badaniach wykorzystano komórki szczurzego guza chromochłonnego nadnerczy PC12-Tet-On, które mają neuroektodermalne pochodzenie oraz zdolność do fenotypowego różnicowania się w kierunku komórek podobnych do neuronów współczulnych, w odpowiedzi na NGF. Komórki PC12 stanowią bardzo dobry model komórkowy do badań szlaków sygnałowych. Ponadto komórki PC12 nie posiadają receptora dla białka BDNF – TrkB [240], co daje możliwość zbadania bezpośredniego wpływu yolkiny na aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych prowadzących do ekspresji *Bdnf* w komórce z wykluczeniem autokrynnego działania wydzielanego przez nią BDNF. W celu potwierdzenia specyficznych właściwości yolkiny zaobserwowanych w komórkach neuropodobnych PC12 wykorzystano linię komórkową H19-7. Są to unieśmiertelnione komórki wyprowadzone z hipokampa szczurzych zarodków, które posiadają receptor TrkB.

W pierwszym kroku, za pomocą testu MTT, sprawdzono wpływ yolkiny na przeżywalność komórek linii PC12 oraz H19-7. W przypadku komórek PC12 (Rys.7.4) nie zaobserwowano toksycznego wpływu yolkiny, a ich przeżywalność była porównywalna do komórek kontrolnych niestymulowanych. Natomiast inkubacja komórek H19-7 z yolkiną spowodowała znaczący wzrost średniej aktywności metabolicznej komórek (do 144%) dla stężenia wynoszącego 100 µg/ml, w porównaniu z komórkami niestymulowanymi (100%) (Rys. 7.20). Zaobserwowany wzrost średniej aktywności metabolicznej komórek H19-7 po stymulacji yolkiną może wskazywać na jej korzystny wpływ na ich wzrost i przeżywalność w badanych warunkach.

W kolejnych etapach badań zweryfikowano czy yolkina jest zdolna do indukcji ekspresji neurotrofiny *Bdnf* w komórkach PC12 oraz H19-7. Badania rozpoczęto od sprawdzenia wpływu yolkiny na ekspresję mRNA *Bdnf* w komórkach PC12. Uzyskane wyniki wskazywały na tendencję wzrostową ekspresji, lecz nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian, rozrzuty w wynikach były bardzo wysokie, ponieważ badana ekspresja pojawiała się w komórkach w bardzo późnym cyklu reakcji PCR (dane nieopublikowane). Z użyciem techniki Western

Blotting wykazano, że yolkina stymuluje komórki PC12 do wzrostu ilości białkowego produktu ekspresji genu *Bdnf* już po 1-godzinnej inkubacji (Rys.7.6). Zaobserwowano, że wewnątrzkomórkowy poziom białka BDNF oscyluje w czasie i po 3 godzinach stymulacji yolkiną poziom BDNF spada do poziomu kontroli, a potem ponownie wzrasta po 6 godzinach. Zmiany w wewnątrzkomórkowym poziomie BDNF, który wzrastał w czasie stymulacji, a następnie malał, obserwowano już wcześniej w neuronach, gdzie aktywacja receptora NMDA powodowała zmiany w ekspresji *Bdnf* [253]. Immunodetekcja białek pochodzących z lizatów komórkowych komórek PC12 stymulowanych yolkiną wykazała obecność izoformy pro-BDNF (28 kDa), natomiast nie zaobserwowano formy dojrzałej m-BDNF (14 kDa). Pro-BDNF może występować w formie pełnego łańcucha polipeptydowego (masa białka 32 kDa) lub skróconego (masa białka 28kDa) lecz jak donoszą badania, nie wpływa to na finalny poziom m-BDNF [80]. Badania innych grup naukowców przeprowadzone na komórkach PC12 również wykazały obecność skróconej izoformy pro-BDNF (28 kDa) metodą Western blotting [254].

Ważnym etapem badań było sprawdzenie czy komórki PC12 zdolne są do wydzielania białka m-BDNF, które jest dojrzałą izoformą BDNF i odpowiada za aktywację szlaków sygnałowych zaangażowanych w szereg procesów, w tym neurogenezę, neurytogenezę, synaptogenezę, procesy odpowiedzialne za przeżycie, plastyczność synaptyczną (LTP) oraz wzrost dendrytów i ich rozgałęzienie [83]. W pożywce pochodzącej zebranej z komórek PC12 inkubowanych z yolkiną wykryto istotne ilości m-BDNF po 2 i 6 godzinach stymulacji (Rys.7.5). Zatem wzrost ekspresji białka pro-BDNF widoczny już po 1-godzinnej stymulacji komórek PC12 z yolkiną, może być powodem wzrostu poziomu m-BDNF wydzielanego przez komórki do medium już po 2 godzinach od stymulacji. Prawdopodobnie, pro-BDNF produkowany wewnątrzkomórkowo i wydzielany na zewnątrz, ulega przekształceniu przez proteazy (obecne w macierzy międzykomórkowej) takie jak metaloproteiny lub plazmina [84], [85] do m-BDNF, wykrywanego w pożywce pochodzącej z komórek PC12 stymulowanych yolkiną. Może to też tłumaczyć brak obecności prążka odpowiadającego m-BDNF (14 kDa) na membranie nitrocelulozowej, na której rozdzielano białka lisatu pochodzącego z komórek PC12 stymulowanych yolkiną i wykrycie m-BDNF testem ELISA, w pożywce pochodzącej zebranej z komórek traktowanych yolkiną.

Wyniki uzyskane dla komórek PC12 potwierdzono na komórkach linii H19-7. Wykazano, że potraktowanie komórek H19-7 yolkiną spowodowało istotny wzrost produkcji m-BDNF i jego pojawienie się w pożywce pochodzącej po 24 godzinach inkubacji (Rys. 7.21). Wcześniej, podobne wyniki uzyskano na komórkach pełnej krwi ludzkiej, gdzie wykazano znaczący wzrost produkcji i wydzielania BDNF po 24 godzinach stymulacji yolkiną (100 µg/ml) [255], oraz na szczurzych neuronach pierwotnych, gdzie zwiększone wydzielanie BDNF obserwowano po 6 i 24 godzinach inkubacji z yolkiną (dane niepublikowane własne). Zaobserwowany wpływ yolki na produkcję i wydzielanie białka m-BDNF przez komórki PC12 oraz H19-7 może być istotnym aspektem w wyjaśnieniu pro-kognitywnego efektu działania yolki, która, jak wykazano wcześniej, usprawniała funkcje poznawcze u myszy z eksperymentalnym modelem choroby Alzheimera oraz u starzejących się szczurów. Dotychczas wykazano, że procesom starzenia towarzyszy znaczący spadek ekspresji *Bdnf* w niektórych regionach mózgu zwierząt i ludzi, zwłaszcza w hipokampie oraz korze przedczołowej [106], [107], [109]. Zredukowany poziom białka BDNF zaobserwowano również w surowicy ludzkiej, co miało związek z wiekiem i występowaniem łagodnych zaburzeń poznawczych [108]. Obecnie, jednym z celów terapeutycznych w leczeniu chorób, w których obserwuje się spadek ekspresji *Bdnf* jest przywrócenie właściwego poziomu tego białka w obszarach mózgu objętych procesem chorobowym [77]. Według doniesień literaturowych, substancje pochodzenia naturalnego mogą

być obiecującym środkiem terapeutycznym. Wykazano, że użycie resweratrolu, który jest polifenolem roślinnym pozyskiwanym (najczęściej) z ciemnych winogron, wraz z fumaranem dimetylu w szczurzym modelu zaburzeń depresyjnych, wykazało działanie antydepresyjne poprzez hamowanie neurozapalenia, a także poprzez wzrost ekspresji *Bdnf* w hipokampie [256]. Inne badania wykazały, że kwas rozmarynowy (uzyskiwany m.in. z Rozmarynu lekarskiego, *Rosmarinus officinalis*), który znany jest ze swoich właściwości antyoksydacyjnych oraz przeciwzapalnych, posiada również właściwości neuroprotektoryjne poprzez wpływ na hamowanie procesu apoptozy neuronów oraz wzrost ekspresji synaptofizyny i *Bdnf* w hipokampie. Jego pozytywne efekty zostały wykazane w zwierzęcych modelach choroby Alzheimera, Parkinsona czy też niedokrwienia mózgu [128]. Kolejnym przykładem może być oroksyлина A (flawonoid pozyskiwany z Tarczycy bajkalskiej, *Scutellaria baicalensis*), która znacząco poprawia funkcje pamięciowe myszy poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego CREB oraz indukcję wzrostu ekspresji *Bdnf* [257].

Wykazana zdolność komórek linii H19-7 do wydzielania białka m-BDNF po 24 godzinach stymulacji yolkiną może wyjaśniać wcześniejszą obserwację, czyli wzrost ich przeżywalności nawet o 44% w stosunku do komórek niestymulowanych. W komórkach PC12 nie wykazano podobnego efektu. Różnica między tymi dwoma liniami komórkowymi dotyczy obecności receptora TrkB, który jest głównym receptorem dla białka m-BDNF. Nguyen i wsp. [239] w komórkach H19-7 traktowanych staurosporyną, która aktywowała proces apoptozy, zaobserwowali zahamowanie tego procesu w przypadku komórek inkubowanych wcześniej z egzogennym białkiem BDNF. Neuroprotektoryjny efekt inkubacji z białkiem BDNF zahamowano po zastosowaniu inhibitora receptora TrkB – K252a. Autorzy wykazali, że efekt zmniejszenia liczby komórek ulegających apoptozie związany był z aktywacją szlaku BDNF-TrkB-PI3K-AKT. Można zatem sugerować, że wydzielany m-BDNF przez komórki H19-7 stymulowane yolkiną może wiązać się z receptorem TrkB i aktywować szlaki, które zwiększają wzrost i przeżywalność tych komórek w porównaniu z komórkami niestymulowanymi, które nie produkowały m-BDNF.

W związku z wykazaną zwiększoną produkcją białka m-BDNF w komórkach PC12 oraz H19-7 stymulowanych yolkiną, kolejne etapy badań miały na celu odkrycie szlaków sygnałowych, które aktywowane są przez yolkinę i mogą prowadzić do zwiększonej produkcji tej neurotrofiny. Jednym z kluczowych czynników transkrypcyjnych, który kontroluje ekspresję *Bdnf* oraz ekspresję innych genów zaangażowanych w kontrolę przeżywalności komórek, a także procesy plastyczności synaptycznej i tworzenie pamięci, jest czynnik CREB [129], [141]. Wykorzystując metodę Western Blotting wykazano, że yolkina zwiększa poziom fosforylacji Ser133 czynnika CREB zarówno w komórkach linii PC12 (Rys. 7.7) jak i H19-7 (Rys. 7.22). Wiadomo, że w odpowiedzi na czynniki aktywujące, takie jak neuroprzekazniki, ligandy lub czynniki wzrostu, w komórce nerwowej uruchamiane są mechanizmy prowadzące do aktywacji czynnika CREB. Kluczowym etapem aktywacji CREB jest fosforylacja reszt serynowych, zwłaszcza seryny w pozycji 133 (Ser133) łańcucha polipeptydowego [132]. Szlaki, które odpowiadają za aktywację czynnika CREB i prowadzą do zwiększonej ekspresji *Bdnf* obejmują: szlaki sygnałowe zależne od wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia, szlaki zależne od wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP i aktywacji PKA, szlak zależny od aktywacji kinaz PI3K/AKT oraz szlak związany z aktywacją kinaz MAP (ERK1/2). Aktywacja tych szlaków pełni również istotną rolę w kontroli procesów wzrostu i przeżycia komórek, neurogenezie, neurytogenezie, a także tworzeniu pamięci długotrwałej [129], [133]. Zatem kolejnym krokiem w badaniach było sprawdzenie jakie szlaki sygnałowe, odpowiedzialne za aktywację czynnika CREB i zwiększoną ekspresję *Bdnf*, mogą zostać aktywowane w odpowiedzi na yolkinę.

Jony wapnia są bardzo ważnymi przekaźnikami wtórnymi, które odgrywają istotną rolę w rozwoju i fizjologii centralnego układu nerwowego [130]. Wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia w neuronach powoduje aktywację kinaz zależnych od jonów wapnia, takich jak CaMKII, CaMKIV, cAMP/PKA, MAPK/ERK oraz PKC [163], [164]. Fosforylacja Ser133 czynnika transkrypcyjnego CREB przez te kinazy prowadzi do indukcji ekspresji wielu białek, w tym BDNF [165]. W związku z tym w kolejnym kroku sprawdzono czy yolkina wpływa na wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia w komórkach PC12 i H19-7. Monitorując zmiany fluorescencji w czasie wykazano, że w komórkach PC12 (Rys.7.8) oraz komórkach H19-7 (Rys.7.23) stymulowanych yolkiną wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia nie zmienia się. Tym samym aktywacji nie powinny ulegać kinazy ściśle zależne od zmian poziomu jonów wapnia, takie jak CaMKII oraz CaMKIV [258]. Można zatem wnioskować, że yolkina nie bierze udziału w aktywacji szlaków komórkowych zależnych od zmian wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia. Mimo, że jony wapnia to bardzo częsty induktor prowadzący do fosforylacji czynnika CREB, w komórkach PC12 wykazano, że może istnieć szlak niezależny od jonów wapnia, lecz zależny od wzrostu poziomu cAMP [259]. Dlatego, w kolejnym etapie badań sprawdzono wpływ yolkina na aktywację szlaków wapniowo-niezależnych w komórkach PC12 oraz H19-7.

cAMP jest ważnym wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem wtórnym uczestniczącym w regulacji wielu procesów regulowanych przez hormony oraz neuroprzekaźniki [146]. Wśród tych procesów można wymienić między innymi przeżycie komórek, ich wzrost i różnicowanie, neurytogenezę, czy metabolizm komórkowy [245], [246]. Jest to również jeden z czynników odpowiedzialnych za indukcję ekspresji *Bdnf* zależnej od aktywacji czynnika transkrypcyjnego CREB [246]. Za syntezę cAMP odpowiedzialna jest cyklaza adenylanowa [245]. Zmiany w wewnątrzkomórkowym poziomie cAMP zachodzące w komórkach PC12 oraz H19-7 w odpowiedzi na yolkinę oznaczono testem ELISA. W komórkach PC12 (Rys.7.9) oraz H19-7 (Rys.7.24) stymulowanych yolkiną zaobserwowano istotny wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP. Synteza cAMP może zachodzić na drodze zależnej lub niezależnej od białka G. W ścieżce sygnałowej zależnej od białka G, po związaniu zewnątrzkomórkowego liganda do GPCR, aktywacji ulega cyklaza adenylanowa związana z błoną komórkową, która przekształca ATP w cząsteczkę cAMP i  $PP_i$  [142]. W ścieżce sygnałowej niezależnej od białka G synteza cAMP zachodzi poprzez aktywację rozpuszczalnej AC poprzez wzrost stężenia jonów wodorowęglanowych i wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia [150]. Z uwagi na brak obserwowanych zmian wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia w komórkach PC12 stymulowanych yolkiną, można przypuszczać, że aktywacji ulega AC związana z błoną komórkową, zależna od aktywacji białka G. Uzyskane obserwacje wskazywałyby na to, iż peptydy wchodzące w skład kompleksu yolkina mogą wiązać się z receptorami GPC i w ten sposób aktywować dalsze szlaki sygnałowe. Jednak znalezienie receptora lub receptorów dla mieszaniny peptydów jest skomplikowanym i czasochłonnym procesem, wymagającym osobnej serii szczegółowych badań, zatem nie był to temat obecnej rozprawy doktorskiej.

Główną cząsteczką efektorową dla cAMP jest kinaza PKA, która może fosforylować reszty seryny i treoniny w kolejnych cząsteczkach, między innymi Ser133 czynnika CREB [260]. Wykazano, że szlak sygnałowy cAMP-PKA-CREB ma kluczowe znaczenie w tworzeniu pamięci. Dodatkowo, jego aktywacja może wywołać działanie przeciwdepresyjne poprzez wzmocnienie plastyczności strukturalnej w hipokampie [261], [262]. Natomiast aktywacja szlaku PKA-CREB, prowadząca do ekspresji *Bdnf*, jest odpowiedzialna za promowanie przeżycia neuronów, modulowanie morfologii synaptycznej i wzmacnianie wydajności transmisji synaptycznej [263]. W zwierzęcych modelach choroby Alzheimera, padaczki i depresji szlak sygnałowy PKA-CREB-BDNF odegrał pozytywną rolę regulacyjną w przeżyciu i rozwoju neuronów, funkcjach

poznawczych i depresji [264]–[266]. Stąd, z uwagi na właściwości pro-kognitywne yolkiny zaobserwowane wcześniej na modelach zwierzęcych oraz wzrost poziomu cAMP, który odpowiada za aktywację kinazy PKA, sprawdzono fosforylację kinazy PKA w komórkach PC12 stymulowanych yolkiną. Wykazano, że w komórkach tych pod wpływem yolkiny, 1,3 krotnie wzrasta fosforylacja Thr197 w kinazie PKA (Rys.7.10). Otrzymane wyniki sugerują, że obserwowany wzrost ekspresji *Bdnf* na poziomie białka, a także wzrost fosforylacji czynnika CREB, który reguluje ten proces może być indukowany w wyniku aktywacji ścieżki cAMP-PKA przez yolkinę. Analogiczną aktywację ścieżki cAMP-PKA-CREB-BDNF zaobserwowano w komórkach PC12 traktowanych gastrodinem – glikozydem fenolowym wyizolowanym z *Gastrodia elata*, chińskiej rośliny wykazującej lecznicze działanie w chorobach OUN. Aktywacja tej ścieżki wiązała się z właściwościami neuroprotekcijnymi gastrodinu i ochroną komórek PC12 przed neurotoksycznym działaniem metamfetaminy [267]. Co ciekawe, w swoich wcześniejszych badaniach autorzy wykazali, że gastrodin podany szczurom z eksperymentalnym modelem ołepienia naczyniowego łagodził deficyty poznawcze [268]. Podobne obserwacje uzyskano również dla etanolowego ekstraktu pochodzącego z Fasoli czarnej (*Rhynchosia volubilis*), którego aktywnymi związkami są głównie antocyjany oraz izoflawonoidy. Wykazano, że ekstrakt podany komórkom HeLa aktywuje ścieżkę cAMP-PKA-CREB i tym samym zwiększa przeżywalność komórek [269]. Inne badania z udziałem substancji naturalnych wykazały, że aktywacja szlaku cAMP-PKA-CREB w komórkach PC12 była odpowiedzialna za wzrost neurytów [270]–[272]. Takiego efektu nie zaobserwowano natomiast na komórkach PC12 stymulowanych yolkiną (Rys.7.13) pomimo aktywacji takiej samej ścieżki sygnałowej, która jednak może odpowiadać za regulację różnych funkcji w komórce.

Aktywacja czynnika transkrypcyjnego CREB może również nastąpić w wyniku działania kinazy AKT, która jest centralnym mediatorem ścieżki aktywowanej przez kinazę PI3K. Ścieżka sygnałowa zależna od aktywacji kinaz PI3K/AKT odgrywa bardzo ważną rolę w regulacji funkcji ośrodkowego układu nerwowego. Szlak ten jest zaangażowany w kontrolę przeżywalności komórek, neurogenezę, proliferację komórek oraz plastyczność synaptyczną [177]. W kolejnym etapie badań sprawdzono czy stymulacja komórek yolkiną powoduje zmiany w fosforylacji Ser473 kinazy AKT. Zaobserwowano, że w komórkach PC12 (Rys.7.11) oraz H19-7 (Rys.7.25) stymulowanych yolkiną zachodzi istotny wzrost fosforylacji Ser473 kinazy AKT, co wskazuje na jej zdolność do fosforylacji kolejnych białek. Prawdopodobnie kinaza AKT ulega aktywacji z udziałem kinazy PI3K, która odpowiedzialna jest za rekrutację AKT do błony komórkowej, a ta ulega fosforylacji przez kinazę PDK1 [178]. Wyniki badań ostatnich lat wykazały, że wiele substancji pochodzenia naturalnego, takich jak kurkumina (polifenol pochodzący z Ostryżu długiego, *Curcuma longa*) czy witeksyna (glikozyd flawonoidowy pochodzący z kwiatów i owoców głogu, *Crataegus*), których działanie oparte jest na aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od kinaz PI3K/AKT, chroni neurony dopaminergiczne, neurony hipokampa oraz neurony korowe przed skutkami stresu oksydacyjnego i neurotoksyczności wywołanej A $\beta$ . Ich neuroprotekcyjne działanie wiązało się z aktywacją szlaku PI3K/AKT/CREB, co powodowało zwiększoną ekspresję *Bdnf* [273], [274]. W komórkach PC12 narażonych na stres oksydacyjny ginsenozyd będący saponiną wyizolowaną z Żeń-szenia właściwego (*Panax ginseng*) zmniejszył populację komórek ulegającą apoptozie dzięki aktywacji szlaku PI3K/AKT oraz zwiększonej ekspresji *Bdnf*, co indukowało również aktywację procesu neurogenezy [275]. Z kolei senegenina (saponina) wyizolowana z korzenia Krzyżownicy (*Radix Polygalae*) zwiększyła przeżywalność komórek PC12 inkubowanych z toksycznym A $\beta$ 1-42 o 50%. Obserwowany efekt zależał między innymi od aktywacji ścieżki PI3K/AKT w komórkach [276].

Kolejnym z badanych szlaków, który może być aktywowany przez yolkinę, prowadząc do aktywacji czynnika CREB, jest szlak zależny od kinaz ERK1/2. W wyniku działania bodźców zewnętrznych takich jak czynniki wzrostu, hormony oraz cytokiny wiążące się z odpowiednimi receptorami, aktywacji ulega kaskada kinaz MAP, których końcowym elementem są między innymi kinazy ERK1/2 [191], [277]. Fosforylowane kinazy ERK1/2 mogą przemieszczać się do jądra komórkowego i tam aktywować czynniki transkrypcyjne, w tym badany w pracy czynnik CREB [277]. Są one również zaangażowane w kontrolę ekspresji *Bdnf* w wyniku aktywacji receptora TrkA, aktywację szlaku cAMP-PKA czy wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia [163], [278], [279]. Kinazy ERK1/2 biorą udział w regulacji wielu procesów takich jak adhezja komórek, migracja, przeżycie, różnicowanie, proliferacja oraz metabolizm [205]. Postanowiono zatem sprawdzić czy kinazy ERK1/2 ulegają aktywacji w wyniku stymulacji komórek yolkiną. Zaobserwowano, że traktowanie komórek PC12 yolkiną (Rys.7.12) spowodowało spadek fosforylacji reszt Thr202 i Tyr204 w kinazach ERK1/2 w pierwszych godzinach stymulacji, a po 12 i 24 godzinach inkubacji z yolkiną poziom fosforylacji istotnie wzrósł. Natomiast w komórkach H19-7 traktowanych yolkiną (Rys.7.26) nie zaobserwowano żadnych zmian w poziomie fosforylacji kinaz ERK1/2 względem komórek nietraktowanych. Obserwowana późna aktywacja ERK1/2 w komórkach PC12 może być związana z ich wpływem na wykazaną wcześniej późną aktywację czynnika CREB w tych komórkach (Rys.7.7). Jednak w komórkach H19-7 nie zaobserwowano zmian w poziomie fosforylacji kinaz ERK1/2, mimo zaobserwowanej wcześniej długotrwałej, późnej aktywacji czynnika CREB (Ryc. 7.22), co prawdopodobnie wskazuje na brak udziału kinaz ERK 1/2 w aktywacji CREB-zależnej produkcji BDNF w komórkach H19-7. Jak wykazaliśmy wcześniej, w komórkach PC12 stymulowanych yolkiną późnej ekspresji ulega karboksypeptydaza E, zwana również neurotroficznym czynnikiem  $\alpha 1$  (NF- $\alpha 1$ ), który znany jest z właściwości neuroprotekcyjnych, niezależnych od swojej aktywności enzymatycznej [280]. Co ciekawe, w komórkach H19-7 stymulowanych yolkiną nie wykazaliśmy żadnych zmian w poziomie białkowego produktu ekspresji genu *NF- $\alpha 1$* . Badania Sharma i wsp. wykazały, że mechanizm neuroprotekcijnego działania NF- $\alpha 1$  przed stresem indukowanym  $H_2O_2$  obejmował między innymi związanie NF- $\alpha 1$  z receptorem serotoninowym 5-HTR1E, a następnie aktywacją ERK1/2. Aktywowane kinazy były zdolne do fosforylacji czynnika CREB, który indukował ekspresję genu antyapoptotycznego *Bcl-2* [281]. Można więc spekulować, że późna aktywacja kinaz ERK1/2 w komórkach PC12 stymulowanych yolkiną może wynikać z aktywacji ścieżki NF- $\alpha 1$ /5-HTR1E/ERK1/2/CREB, co wyjaśniałoby brak podobnej obserwacji w komórkach H19-7. Jednak trzeba mieć na uwadze, że czynnik transkrypcyjny CREB jest cząsteczką regulującą w komórce wiele procesów, dlatego szczegółowe wyjaśnienie tej obserwacji potrzebowałoby dodatkowych badań, które nie były przedmiotem obecnej rozprawy.

### **III. Kompleks peptydowy yolkina wykazuje odmienny wpływ na morfologię komórek PC12 oraz H19-7**

W celu identyfikacji dojrzałych neuronów oznacza się poziom ekspresji markerów białkowych, takich jak neuronalne białko jądrowe (NeuN, ang. neuronal nuclear protein) [57] oraz białko towarzyszące mikrotubulom 2 (MAP-2, ang. microtubule-associated protein 2) [58]. Natomiast białkiem pozwalającym na śledzenie zmian związanych z synaptogenezą jest między innymi synapsyna I, która związana jest z wydłużeniem aksonów, tworzeniem synaps i regulacją fuzji pęcherzyków synaptycznych [59]. W kolejnym etapie badań sprawdzono czy yolkina aktywuje proces neurogenezy, tworzenie wypustek nerwowych oraz synaps. Komórki inkubowano z yolkiną i obserwowano zmiany w morfologii komórek z użyciem mikroskopu świetlnego z kontrastem fazowym. Komórki PC12 stymulowane yolkiną nie wykazały zmian w morfologii (Rys.7.13 C). Nie zaobserwowano tworzenia wypustek nerwowych oraz zmiany kształtu ciała

komórkowego, tak jak widoczne to było w komórkach referencyjnych traktowanych NGF (Rys.7.13 B). Jak wykazano we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych na modelu komórek neuropodobnych linii PC12, traktowanie ich estrem TFSA (ang. tenuifoliside A) wyizolowanym z Krzyżownicy cienkolistej (*Polygala tenuifolia*), indukowało wzrost neurytów zależny od aktywacji ścieżki MEK/ERK1/2/CREB oraz PI3K/AKT [282]. Natomiast inne badania z użyciem alkaloidu pochodzącego z azjatyckiej rośliny Wampi (*Clausena lansium*), wykazały, że wzrost neurytów w komórkach PC12 był zależny od kinaz ERK1/2, wykluczając udział kinaz PI3K/AKT [283]. Mimo, iż w komórkach PC12 stymulowanych yolkiną wykazano długotrwałą aktywację kinazy AKT oraz późną aktywację kinaz ERK1/2, nie zaobserwowano, by miało to związek z indukcją procesu neurogenety. Dodatkowo, w komórkach PC12 stymulowanych yolkiną nie wykazano żadnych zmian w poziomie białkowego produktu ekspresji *Synapsyny I* (markera synaptogenezy), *NeuN* (markera dojrzałych neuronów) oraz *MAP-2* (markera dendrytów) (Rys. 7.13D; Rys.7.14). Dane literaturowe wskazują, że ekspresja *Synapsyny I* zależna jest od poziomu zróżnicowania komórek [284]. W komórkach PC12, które ulegały różnicowaniu bardzo szybko obserwowano wzrost ekspresji mRNA oraz białkowego produktu *Synapsyny I*, miało to miejsce już po 24 godzinach od depolaryzacji za pomocą KCl [285]. Autorzy wykazali, że ekspresja *Synapsyny I* wiązała się z aktywacją kinaz ERK1/2 oraz czynnika transkrypcyjnego CREB. W przypadku komórek PC12 traktowanych yolkiną, mimo aktywacji tych samych szlaków sygnałowych, nie zaobserwowano zmian świadczących o inicjacji procesu neurogenety oraz tworzenia wypustek nerwowych, stąd też brak obserwowanych zmian w poziomie białkowego produktu ekspresji *Synapsyny I*, będącej markerem synaptogenezy, jest uzasadniony.

Przeprowadzając badania nad wpływem yolki na proces neurogenety i tworzenie wypustek nerwowych na modelu unieśmiertnionych pierwotnych komórek hipokampa H19-7 udało się wykazać jej troficzne działanie. Komórki H19-7 stymulowane yolkiną tworzyły dodatkowe wypustki nerwowe, a ich ciało komórkowe przybierało wrzecionowaty kształt. Niestety, zmiany te obserwowano tylko u pojedynczych komórek w badanej populacji (Rys.7.27), w przeciwieństwie do komórek H19-7 stymulowanych czynnikiem różnicującym bFGF. Ponadto, w przypadku komórek H19-7 nie udało się wykryć obecności białka NeuN za pomocą użytych, dostępnych komercyjnie przeciwciał. Nie wykazano również żadnych zmian w poziomie białkowego produktu ekspresji *Synapsyny I*. Ciekawe jest to, że w literaturze dostępnych jest niewiele prac pokazujących ekspresję *NeuN* w komórkach H19-7. Immunohistochemiczna charakterystyka różnicowanych komórek H19-7 wykazała, że jedynie 35% komórek jest zdolnych do ekspresji białka NeuN, natomiast prawie wszystkie komórki wykazały ekspresję innych białkowych markerów neurogenety takich jak NeuroD czy NF68 [286]. Z kolei, w komórkach PC12 białko NeuN jest kluczowym markerem o wysokim stopniu ekspresji, pozwalającym na określenie stopnia dojrzałości komórek neuronalnych [284], [287]. W komórkach H19-7 traktowanych yolkiną zaobserwowano ponadto wzrost poziomu białkowego produktu ekspresji *MAP-2*, który jest markerem dendrytogenezy (Rys.7.28). Uzyskany wynik może potwierdzać obserwowane zmiany w morfologii komórek H19-7 stymulowanych yolkiną, w których zaobserwowano pojawienie się dodatkowych rozgałęzień, prawdopodobnie dendrytów. Pojawianie się dodatkowych wypustek nerwowych w odpowiedzi na obecność yolki widoczne było jedynie u pojedynczych komórek H19-7, nie w całej populacji komórek.

Jak wykazano, yolki wywołuje odmienny wpływ na morfologię komórek H19-7 w porównaniu z komórkami PC12. To co różni oba modele komórkowe to z pewnością obecność receptora TrkB na komórkach H19-7, który, jak podają dane literaturowe, wiążąc się z m-BDNF ulega fosforylacji i aktywuje szereg szlaków sygnałowych w komórce odpowiedzialnych między innymi za wzrost dendrytów [288]. Jak wykazała Hromadkova i wsp. [289] traktowanie komórek



ludzkiej linii neuroblastoma SH-SY5Y kwasem retinowym oraz białkiem BDNF powodowało różnicowanie się tych komórek do fenotypu neuronalnego. Autorzy wykazali również, że kluczowym czynnikiem i regulatorem ekspresji markera aksonalnego (tau) oraz dendrytycznego (MAP-2) było białko BDNF. Dodatkowo efekt ten był zależny od konstytutywnej ekspresji receptora TrkB. Można zatem sugerować, że to właśnie obecność receptora TrkB w komórkach H19-7, a jego brak w komórkach PC12, tłumaczy obserwowane różnice w morfologii oraz poziomie ekspresji białka MAP-2 w obu liniach komórkowych.

#### **IV. Kompleks peptydowy yolkina nie posiada własnej aktywności przeciwutleniającej, ale może regulować aktywność systemu antyoksydacyjnego**

W 1956 roku po raz pierwszy opisano potencjalny związek między produkcją wolnych rodników tlenowych i ich szkodliwym wpływem na organizm, wskazując starzenie jako proces spowodowany przez wolne rodniki [39]. Wraz z wiekiem, w wyniku działania wolnych rodników wzrasta liczba uszkodzonych makrocząsteczek, które wpływają na pogorszenie funkcjonowania organizmu. Zatem rola stresu oksydacyjnego w procesie starzenia wydaje się bardzo istotna, dodatkowo mózg jest organem bardzo wrażliwym na stres oksydacyjny. Mechanizmy, za pośrednictwem których ROS powodują uszkodzenia tkanki mózgowej, prowadzą do zwiększenia przepuszczalności bariery krew-mózg oraz do zmian morfologii mózgu [40]. Wykazano, że substancje, które posiadają neuroprotektoryjne właściwości mogą być również antyoksydantami [248]. W związku z tym w kolejnej części badań skupiono się na sprawdzeniu czy kompleks peptydowy yolkina posiada właściwości antyoksydacyjne lub czy jest zdolny do regulacji systemu antyoksydacyjnego.

W pierwszej kolejności zbadano wpływ yolkiny na poziom wolnych rodników tlenowych w komórkach PC12. ROS są jednymi z najważniejszych czynników biorących udział w regulacji procesów fizjologicznych w komórkach eukariotycznych. Pełnią one między innymi rolę mediatorów w procesach wzrostu, dojrzewania i apoptozy komórek, regulują poziom energii w komórkach, modulują ekspresję genów, kontrolują przebieg reakcji zapalnej oraz procesy sygnalizacji komórkowej [31]. Jednak w sytuacji, gdy proces generowania reaktywnych form tlenu w komórce istotnie przekracza zdolność ich neutralizacji dochodzi do przesunięcia równowagi w kierunku reakcji utleniania i rozwoju stresu oksydacyjnego, który jest jednym z elementarnych przyczyn rozwoju wielu chorób oraz odgrywa ważną rolę w przyspieszeniu procesów starzenia [34] [33]. W celu określenia zdolności yolkiny do hamowania indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach PC12, zbadano jej wpływ na wewnątrzkomórkowy poziom wolnych rodników tlenowych poprzez pomiar utleniania sondy dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH-DA), stosując 75µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jako zewnątrzkomórkowe źródło wolnych rodników. Wykazano, że inkubacja komórek PC12 z yolkiną nie indukuje zmian w wewnątrzkomórkowym poziomie ROS - ich poziom utrzymywał się na poziomie porównywalnym do komórek kontrolnych, nietraktowanych (Rys. 7.15 A). Z kolei w komórkach PC12 traktowanych H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, poziom ROS obniżył się dzięki jednoczesnemu podaniu yolkiny (Rys.7.15 B), co może wskazywać na jej zdolność do aktywacji systemu obrony antyoksydacyjnej. Podobne badania przeprowadzone na komórkach PC12 przez Rojo i wsp. [184] wykazały, że obniżenie ROS indukowanych przez traktowanie komórek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wiązało się z aktywacją kinaz PI3K/AKT oraz zwiększoną ekspresją *Cu/Zn-SOD* oraz *Mn-SOD*, które ochroniły komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Inne badania na komórkach PC12 potraktowanych H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wraz z ekstraktem roślinnym z liści bambusa (*Sasa borealis*) wykazały, że ekstrakt ochronił komórki PC12 poprzez redukcję wewnątrzkomórkowego poziomu ROS oraz zwiększoną ekspresję enzymów antyoksydacyjnych, w tym *Mn-SOD* [290]. Opierając się o dane literaturowe, w kolejnym kroku, stosując metodę ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy

zmierzono wpływ yolkiny na ekspresję mRNA cytozolowej (*Cu/Zn-SOD*) oraz mitochondrialnej (*Mn-SOD*) dysmutazy ponadtlenkowej, które stanowią pierwszą linię obrony w repertuarze enzymów antyoksydacyjnych [36]. Wykazano, że w komórkach PC12 traktowanych 75  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zachodzi wzrost ekspresji obu izoform SOD (Rys. 7.16). Sam kompleks yolkina również powodował podobny wzrost poziomu ekspresji mRNA *Cu/Zn-SOD* oraz *Mn-SOD*. Natomiast nie zauważono istotnych różnic między stymulacją komórek PC12 samym  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a  $\text{H}_2\text{O}_2$  podanym z yolkiną. Wykazana wcześniej zdolność yolkiny do aktywacji kinaz PI3K/AKT w komórkach PC12 może sugerować, że obserwowany spadek poziomu ROS związany jest z aktywacją szlaku PI3K/AKT oraz zwiększoną ekspresją *Cu/Zn-SOD* oraz *Mn-SOD* w komórkach PC12, jak wykazali też inni autorzy.

W kolejnym etapie sprawdzono aktywność przeciwutleniającą yolkiny obejmującą ocenę zdolności yolkiny do neutralizacji wolnych rodników, redukcji stopnia utlenienia jonów żelaza oraz chelatacji jonów żelaza. Przeprowadzone badania wykazały, że kompleks peptydowy yolkina nie jest zdolny do usuwania rodnika DPPH, a wartości utrzymywały się na poziomie bliskim zeru (Tabela 7.3). Popularne i dobrze przebadane antyoksydanty takie jak np. kwercetyna lub katechina, w teście DPPH wykazują aktywność na poziomie  $>1 \mu\text{M}$  Trolox<sub>eq</sub> [291], [292]. Ekstrakty roślinne, które są bardzo bogate w polifenole wykazują bardzo dobre właściwości antyoksydacyjne i ich zdolność do usuwania rodnika DPPH osiąga wartości wynoszące 200-800  $\mu\text{M}$  Trolox<sub>eq</sub> [293], [294]. Wiele reakcji rodnikowych indukowanych jest przez jony żelaza ( $\text{Fe}^{2+}$ ) dzięki ich zdolności do przenoszenia pojedynczych elektronów. Dlatego zdolność do redukcji stopnia utlenienia jonów żelaza lub zdolność do ich chelatacji przez cząsteczki jest bardzo cenną właściwością antyoksydantów [295]. W niniejszej pracy wykazano, że yolkina nie posiada zdolności redukcji stopnia utlenienia jonów żelaza, a jej zdolność do chelatacji jonów  $\text{Fe(II)}$  jest bardzo niska (bliska zeru), nawet dla yolkiny o stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  (Tabela 7.3). Z danych literaturowych wynika, że zdolność do redukcji stopnia utlenienia jonów żelaza oraz do ich chelatacji jest cechą przypisywaną głównie polifenolom, które są bardzo silnymi antyoksydantami [291], [292].

Yolkina nie wykazała własnej aktywności przeciwutleniającej, w związku z tym obserwowane znaczne obniżenie poziomu ROS w komórkach PC12 stymulowanych  $\text{H}_2\text{O}_2$  i yolkiną może wskazywać na wpływ yolkiny na regulację istniejącego układu antyoksydacyjnego, między innymi poprzez zwiększenie ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej. Podobne właściwości regulacyjne układu antyoksydacyjnego zostały wykazane dla nonapetydu NP-POL wyizolowanego z kompleksu peptydowego bogatego w prolinę (PRP) pochodzącego z siary owczej [296]. NP-POL nie wykazał własnej aktywności przeciwutleniającej, ale posiadał zdolność do regulacji aktywności układu antyoksydacyjnego. Podobnie jak yolkina obniżał poziom ROS i zwiększał ekspresję *Cu/Zn-SOD* oraz *Mn-SOD* [296], [297].

## **V. Kompleks peptydowy yolkina chroni komórki PC12 przed zagregowanym $\text{A}\beta_{1-42}$ i hamuje jego proces agregacji**

W wyniku starzenia oraz w warunkach patologicznych produkcja amyloidu beta wzrasta, a efektywność jego usuwania spada, co prowadzi do jego nadmiernej akumulacji i tworzenia toksycznych i nierozpuszczalnych agregatów [26]. Agregaty  $\text{A}\beta_{1-42}$  gromadzą się w różnych regionach mózgu i stanowią kluczowy czynnik patologiczny prowadzący do degeneracji komórek nerwowych poprzez bezpośrednią interakcję z błoną, indukcję stresu oksydacyjnego poprzez tworzenie kompleksu metal- $\text{A}\beta$ , zakłócenie funkcjonowania receptorów błonowych, zmianę aktywacji szlaków sygnałowych, tworzenie porów błonowych lub zaburzenie homeostazy jonowej w komórce [49], [51]. W związku z tym celem kolejnych badań niniejszej pracy doktorskiej było

sprawdzenie zdolności yolki do hamowania toksycznego wpływu A $\beta$ 1-42 na komórki neuropodobne PC12. Za pomocą testu MTT wykazano, że agregowany A $\beta$ 1-42 (20  $\mu$ M) obniżał żywotność komórek PC12 do 60%, natomiast inkubacja komórek z agregowanym A $\beta$ 1-42 podanym jednocześnie z yolką spowodowała zauważalny wzrost ich przeżywalności nawet do 80% (Rys. 7.17A). Ponadto wykazano, że yolka hamowała częściowo proces degeneracji neurytów indukowany agregowanym A $\beta$ 1-42 w różnicowanych komórkach PC12 (Rys.7.17 D). Kluczowe znaczenie miało również przeprowadzenie analizy przebiegu procesu agregacji A $\beta$ 1-42 w obecności yolki z użyciem barwnika ThT (Rys.7.18) oraz z użyciem techniki TEM (Rys.7.19). Przeprowadzone obserwacje wykazały, że kompleks yolki wykazuje zdolność do hamowania powstawania agregatów białka A $\beta$ 1-42. Podobne obserwacje i działanie wykazano w przypadku ekstraktu z Czosnku różowego (*Allium roseum*), który jest bogaty w związki siarkoorganiczne i flawonoidy i znany jest ze swojego działania antyoksydacyjnego [298]. Wykazano, że inkubacja komórek SH-SY5Y z ekstraktem z czosnku oraz A $\beta$ 1-42 powodowała istotny wzrost ich żywotności w odniesieniu do komórek inkubowanych z samym A $\beta$ 1-42. Dodatkowo wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia ekstraktu obserwowano hamowanie agregacji A $\beta$ 1-42 w analizie fluorescencyjnej z barwnikiem ThT, co zostało potwierdzone również w obrazowaniu z użyciem techniki TEM. Dodatkowo, w przypadku najwyższego stężenia podawanego ekstraktu (100  $\mu$ g/ml) zaobserwowano całkowite zahamowanie tworzenia włókienek amyloidowych. Inkubacja A $\beta$ 1-42 z yolką o stężeniu 100  $\mu$ g/ml dawała podobny efekt. Właściwości ochronne wykazuje również senegenina – saponina wyizolowana z korzenia Krzyżownicy (*Radix Polygalae*) [276]. Inkubacja komórek PC12 z senegeniną podaną wraz z A $\beta$ 1-42 powodowała istotny wzrost ich przeżywalności w porównaniu z komórkami traktowanymi samym A $\beta$ 1-42. Ochronne działanie wiązało się z aktywacją ścieżki zależnej od kinaz PI3K/AKT oraz ekspresji genów antyapoptotycznych, w tym *Bcl-2*. Dodatkowo, inne badania z wykorzystaniem senegeniny wykazały, że zróżnicowane komórki PC12 traciły wypustki nerwowe w wyniku toksycznego działania peptydu A $\beta$ 25-35, natomiast obecność senegeniny wywierała efekt neuroochronny [299], podobnie jak obserwowano w przypadku kompleksu yolki w przypadku inkubacji z A $\beta$ 1-42. Obecnie poszukuje się nowych rozwiązań, które skutecznie hamowałyby proces agregacji toksycznych peptydów A $\beta$ . Jednym z obranych celów jest zmniejszenie produkcji A $\beta$ , poprzez zahamowanie aktywności enzymatycznej  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekreazy. Jednak ze względu na ich ważne funkcje w komórce nerwowej, zahamowanie ich aktywności mogłoby być bardzo niekorzystne [300]. Ponadto, w związku z tym, że monomery A $\beta$  pełnią również ważną rolę dla układu nerwowego, uczestnicząc m.in. w regulacji plastyczności synaptycznej i procesów związanych z pamięcią, niekorzystnym wydaje się zahamowanie ich całkowitej produkcji [49]. Bezpiecznym rozwiązaniem wydaje się być zahamowanie początkowych etapów agregacji monomerów, dimerów czy oligomerów A $\beta$  (głównie procesu zasiewania oraz wzrostu fibryli) poprzez zastosowanie substancji niskocząsteczkowych, które byłyby zdolne do maskowania potencjalnych miejsc odpowiedzialnych za kontrolę procesu agregacji. Oprócz związków chemicznych projektowanych docelowo jako inhibitory A $\beta$  poszukiwania obejmują również związki pochodzące z naturalnych źródeł. Wśród nich potencjalne działanie jako inhibitor procesu agregacji A $\beta$  posiadają kurkumina (polifenol pochodzący z Ostryżu długiego, *Cucurma longa*), mirycetyna (flawonoid, którego największe źródło to Orzech włoski, *Juglans regia*), resweratrol (polifenol pochodzący z Winorośli właściwej, *Vitis vinifera*) oraz kwas rozmarynowy (ester, którego źródłem jest Rozmaryn, *Rosmarinus*) [301]. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań nad yolką sugerują, że kompleks ten wykazuje potencjalne ochronne działanie przed gromadzącymi się toksycznymi agregatami białka A $\beta$ 1-42. Opierając się o analizę przebiegu krzywej agregacji amyloidu beta w obecności yolki można spekulować, że potencjalny inhibitorowy mechanizm działania yolki może wynikać z jej

zdolności do interakcji z monomerycznym A $\beta$ , prowadzącej do zahamowania tzw. procesu zasiewania.

Podsumowując, wyniki przedstawione w niniejszej pracy pozwoliły na dokładną charakterystykę kompleksu peptydowego yolkina, który po raz pierwszy został wyizolowany i scharakteryzowany dekadę temu. Udało się wykazać, że kompleks peptydowy yolkina stymuluje komórki neuropodobne linii PC12 oraz unieśmiertelnione pierwotne komórki hipokampa H19-7 do aktywacji ścieżek sygnałowych zależnych od aktywności PI3K/AKT oraz cAMP-PKA, które zaangażowane są w procesy proprzeżyciowe i ochronne, poprzez aktywację czynnika CREB oraz zwiększoną ekspresję *Bdnf*. Dodatkowo wykazano, że yolkina mimo, iż nie posiada własnej aktywności przeciwutleniającej aktywuje system obrony antyoksydacyjnej i chroni komórki przed szkodliwym działaniem wolnych rodników tlenowych oraz toksycznym działaniem agregatów białka A $\beta$ 1-42. Wykazane ochronne i prokognitywne działanie yolkiny sprawia, że kompleks ten wydaje się być potencjalnym kandydatem na nutraceutyk, z możliwością zastosowania w prewencji i wspomaganiu leczenia zaburzeń towarzyszących procesom starzenia.

## 9. Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały, że:

1. Kompleks peptydowy yolkina pozbawiony jest zanieczyszczeń mikrobiologicznych, jest bardzo stabilny w roztworze PBS, i może być przechowywany w takiej formie przez długi okres czasu.
2. Badany kompleks wykazuje homologię do witellogeniny I oraz witellogeniny II.
3. Stymulacja komórek PC12 oraz H19-7 yolkiną prowadzi do zwiększonej produkcji białka m-BDNF.
4. Pod wpływem yolkiny w komórkach PC12 oraz H19-7 aktywacji ulegają kinazy PI3K/AKT oraz cAMP-PKA, które powodują aktywację czynnika CREB odpowiedzialnego za zwiększoną ekspresję *Bdnf*.
5. Zmiany w morfologii komórek H19-7 traktowanych yolkiną wynikają prawdopodobnie z działania m-BDNF, który wiąże się z receptorem TrkB, obecnym na powierzchni tych komórek. Podobnych zmian nie zaobserwowano w komórkach PC12 (TrkB-).
6. Yolkina nie posiada własnej aktywności przeciwutleniającej, ale jest zdolna do obniżania poziomu ROS w komórkach PC12 oraz regulacji systemu antyoksydacyjnego poprzez zwiększenie ekspresji *Cu/Zn-SOD* oraz *Mn-SOD*.
7. Yolkina hamuje proces agregacji białka A $\beta$ 1-42 oraz posiada zdolność do ochrony komórek nerwowych przed toksycznym działaniem gromadzących się agregatów A $\beta$ 1-42.

## 10. Bibliografia

- [1] S.-H. Kim i S. Park, „A Meta-Analysis of the Correlates of Successful Aging in Older Adults”, *Res Aging*, t. 39, nr 5, s. 657–677, cze. 2017, doi: 10.1177/0164027516656040.
- [2] B. A. Yankner, T. Lu, i P. Loerch, „The Aging Brain”, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, t. 3, nr 1, s. 41–66, luty 2008, doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.2.010506.092044.
- [3] J. P. de Magalhães, D. Wuttke, S. H. Wood, M. Plank, i C. Vora, „Genome-Environment Interactions That Modulate Aging: Powerful Targets for Drug Discovery”, *Pharmacol Rev*, t. 64, nr 1, s. 88–101, sty. 2012, doi: 10.1124/pr.110.004499.
- [4] P. E. Ludwig, V. Reddy, i M. Varacallo, *Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS)*. StatPearls Publishing, 2021. Dostęp: 21 lipiec 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442010/>
- [5] R. D. Fields, „Change in the Brain’s White Matter”, *Science*, t. 330, nr 6005, s. 768–769, lis. 2010, doi: 10.1126/science.1199139.
- [6] A. A. Mercadante i P. Tadi, *Neuroanatomy, Gray Matter*. StatPearls Publishing, 2021. Dostęp: 26 czerwiec 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553239/>
- [7] S. Herculano-Houzel, „The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain”, *Frontiers in Human Neuroscience*, t. 3, 2009, Dostęp: 25 czerwiec 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/neuro.09.031.2009>
- [8] P. E. Ludwig, V. Reddy, i M. Varacallo, *Neuroanatomy, Neurons*. StatPearls Publishing, 2021. Dostęp: 25 lipiec 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441977/>
- [9] A. E. Pereda, „Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses”, *Nat Rev Neurosci*, t. 15, nr 4, s. 250–263, 2014, doi: 10.1038/nrn3708.
- [10] S. D. Niyonambaza i in., „A Review of Neurotransmitters Sensing Methods for Neuro-Engineering Research”, *Applied Sciences*, t. 9, nr 21, Art. nr 21, sty. 2019, doi: 10.3390/app9214719.
- [11] S. Jäkel i L. Dimou, „Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation”, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, t. 11, 2017, Dostęp: 26 czerwiec 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2017.00024>
- [12] I. Lago-Baldaia, V. M. Fernandes, i S. D. Ackerman, „More Than Mortar: Glia as Architects of Nervous System Development and Disease”, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, t. 8, 2020, Dostęp: 26 czerwiec 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.611269>
- [13] L. L. Beason-Held i B. Horwitz, „Aging Brain”, w *Encyclopedia of the Human Brain*, V. S. Ramachandran, Red. New York: Academic Press, 2002, s. 43–57. doi: 10.1016/B0-12-227210-2/00009-1.
- [14] A. M. Hedman, N. E. M. van Haren, H. G. Schnack, R. S. Kahn, i H. E. Hulshoff Pol, „Human brain changes across the life span: A review of 56 longitudinal magnetic resonance imaging studies”, *Hum. Brain Mapp.*, t. 33, nr 8, s. 1987–2002, sie. 2012, doi: 10.1002/hbm.21334.
- [15] R. Peters, „Ageing and the brain”, *Postgraduate Medical Journal*, t. 82, nr 964, s. 84–88, luty 2006, doi: 10.1136/pgmj.2005.036665.
- [16] M. Liguz-Lęcznar, „Osłabienie sprawności poznawczej w starzeniu. Przyczyny i mechanizmy neurobiologiczne”, *Gerontologia Polska*, t. 3, s. 166–171, 2014.
- [17] J. H. Morrison i M. G. Baxter, „The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline”, *Nat Rev Neurosci*, t. 13, nr 4, Art. nr 4, kwi. 2012, doi: 10.1038/nrn3200.
- [18] L. Nyberg i in., „Longitudinal evidence for diminished frontal cortex function in aging”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, t. 107, nr 52, s. 22682–22686, grudz. 2010, doi: 10.1073/pnas.1012651108.
- [19] L. E. B. Bettio, L. Rajendran, i J. Gil-Mohapel, „The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline”, *Neurosci Biobehav Rev*, t. 79, s. 66–86, sie. 2017, doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.04.030.
- [20] J. Persson, S. Pudas, J. Lind, K. Kauppi, L.-G. Nilsson, i L. Nyberg, „Longitudinal Structure-Function Correlates in Elderly Reveal MTL Dysfunction with Cognitive Decline”, *Cerebral Cortex*, t. 22, nr 10, s. 2297–2304, paź. 2012, doi: 10.1093/cercor/bhr306.
- [21] M. T. Mc Auley, Guimera, A. M., Hodgson, D., McDonald, N., Mooney, K. M., Morgan, A. E., & Proctor, C. J. „Modelling the molecular mechanisms of aging”, *Bioscience Reports*, t. 37, nr 1, s. BSR20160177, luty 2017, doi: 10.1042/BSR20160177.
- [22] A. Zia, A. M. Pourbagher-Shahri, T. Farkhondeh, i S. Samarghandian, „Molecular and cellular pathways contributing to brain aging”, *Behav Brain Funct*, t. 17, nr 1, s. 6, grudz. 2021, doi: 10.1186/s12993-021-00179-9.

- [23] M. M. Adams, Shi, L., Linville, M. C., Forbes, M. E., Long, A. B., Bennett, C., Newton, I. G., Carter, C. S., Sonntag, W. E., Riddle, D. R., & Brunso-Bechtold, J. K., „Caloric restriction and age affect synaptic proteins in hippocampal CA3 and spatial learning ability”, *Experimental Neurology*, t. 211, nr 1, s. 141–149, maj 2008, doi: 10.1016/j.expneurol.2008.01.016.
- [24] J. M. de Brabander, R. J. Kramers, i H. B. Uylings, „Layer-specific dendritic regression of pyramidal cells with ageing in the human prefrontal cortex”, *Eur J Neurosci*, t. 10, nr 4, s. 1261–1269, kw. 1998, doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00137.x.
- [25] D. Riga, S. Riga, F. Halalau, i F. Schneider, „Brain lipopigment accumulation in normal and pathological aging”, *Ann N Y Acad Sci*, t. 1067, s. 158–163, maj 2006, doi: 10.1196/annals.1354.019.
- [26] M. Press, T. Jung, J. König, T. Grune, i A. Höhn, „Protein aggregates and proteostasis in aging: Amylin and  $\beta$ -cell function”, *Mechanisms of Ageing and Development*, t. 177, s. 46–54, sty. 2019, doi: 10.1016/j.mad.2018.03.010.
- [27] J. Budni, T. Bellettini-Santos, F. Mina, M. L. Garcez, i A. I. Zugno, „The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer’s disease”, *Aging Dis*, t. 6, nr 5, s. 331–341, wrz. 2015, doi: 10.14336/AD.2015.0825.
- [28] D. M. Norden i J. P. Godbout, „Review: Microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation: Increased microglial reactivity with age”, *Neuropathol Appl Neurobiol*, t. 39, nr 1, s. 19–34, luty 2013, doi: 10.1111/j.1365-2990.2012.01306.x.
- [29] S. Grimm, A. Hoehn, K. J. Davies, i T. Grune, „Protein oxidative modifications in the ageing brain: Consequence for the onset of neurodegenerative disease”, *Free Radical Research*, t. 45, nr 1, s. 73–88, sty. 2011, doi: 10.3109/10715762.2010.512040.
- [30] H. Sies i D. P. Jones, „Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents”, *Nat Rev Mol Cell Biol*, t. 21, nr 7, Art. nr 7, lip. 2020, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
- [31] G. Bresciani, I. B. M. da Cruz, i J. González-Gallego, „Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation”, *Adv Clin Chem*, t. 68, s. 87–130, 2015, doi: 10.1016/bs.acc.2014.11.001.
- [32] K. T. Kishida i E. Klann, „Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory”, *Antioxid Redox Signal*, t. 9, nr 2, s. 233–244, luty 2007, doi: 10.1089/ars.2007.9.ft-8.
- [33] E. Singh i G. Devasahayam, „Neurodegeneration by oxidative stress: a review on prospective use of small molecules for neuroprotection”, *Mol Biol Rep*, t. 47, nr 4, s. 3133–3140, kw. 2020, doi: 10.1007/s11033-020-05354-1.
- [34] J. Luo, K. Mills, S. le Cessie, R. Noordam, i D. van Heemst, „Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next?”, *Ageing Res Rev*, t. 57, s. 100982, sty. 2020, doi: 10.1016/j.arr.2019.100982.
- [35] S. K. Mehta i S. J. T. Gowder, *Members of Antioxidant Machinery and Their Functions*. IntechOpen, 2015. doi: 10.5772/61884.
- [36] V. C. Culotta, M. Yang, i T. V. O’Halloran, „Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal”, *Biochim Biophys Acta*, t. 1763, nr 7, s. 747–758, lip. 2006, doi: 10.1016/j.bbamer.2006.05.003.
- [37] E. Lubos, J. Loscalzo, i D. E. Handy, „Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities”, *Antioxidants & Redox Signaling*, t. 15, nr 7, s. 1957–1997, paź. 2011, doi: 10.1089/ars.2010.3586.
- [38] A. Nandi, L.-J. Yan, C. K. Jana, i N. Das, „Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, t. 2019, s. 1–19, lis. 2019, doi: 10.1155/2019/9613090.
- [39] D. Harman, „Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry”, *J Gerontol*, t. 11, nr 3, s. 298–300, lip. 1956, doi: 10.1093/geronj/11.3.298.
- [40] S. Salim, „Oxidative Stress and the Central Nervous System”, *J Pharmacol Exp Ther*, t. 360, nr 1, s. 201–205, sty. 2017, doi: 10.1124/jpet.116.237503.
- [41] Y. Gu, C. M. Dee, i J. Shen, „Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability”, *Front Biosci (Schol Ed)*, t. 3, nr 4, s. 1216–1231, cze. 2011, doi: 10.2741/222.
- [42] X. Wang i E. K. Michaelis, „Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain”, *Front Aging Neurosci*, t. 2, s. 12, 2010, doi: 10.3389/fnagi.2010.00012.
- [43] A. Michalak, J. Krzeszowiak, i I. Markiewicz-Górka, „Starzenie się organizmu a stres oksydacyjny oraz zmniejszona sprawność systemów naprawczych”, *Postepy Hig Med Dosw*, t. 68, s. 1483–1491, 2014.

- [44] X. Sun, W.-D. Chen, i Y.-D. Wang, „ $\beta$ -Amyloid: The Key Peptide in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease”, *Frontiers in Pharmacology*, t. 6, 2015, Dostęp: 3 lipiec 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2015.00221>
- [45] G. Chen, Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E., „Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development”, *Acta Pharmacol Sin*, t. 38, nr 9, s. 1205–1235, wrz. 2017, doi: 10.1038/aps.2017.28.
- [46] M. Fändrich, „Oligomeric Intermediates in Amyloid Formation: Structure Determination and Mechanisms of Toxicity”, *Journal of Molecular Biology*, t. 421, nr 4, s. 427–440, sie. 2012, doi: 10.1016/j.jmb.2012.01.006.
- [47] D. Nowak, W. Słupski, i M. Rutkowska, „Nowe strategie terapeutyczne choroby Alzheimer”, *Postepy Hig Med Dosw*, t. 75, s. 474–490, 2021.
- [48] M. Marszałek, „Choroba Alzheimer a produkty degradacji białka APP. Formowanie i różnorodność form fibrylujących peptydów – wybrane aspekty”, *Postepy Hig Med Dosw*, t. 70, s. 787–796, 2016.
- [49] D. Puzzo, Privitera, L., Leznik, E., Fà, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., & Arancio, O., „Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus”, *J Neurosci*, t. 28, nr 53, s. 14537–14545, grudz. 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008.
- [50] Y.-R. Huang i R.-T. Liu, „The Toxicity and Polymorphism of  $\beta$ -Amyloid Oligomers”, *Int J Mol Sci*, t. 21, nr 12, s. E4477, cze. 2020, doi: 10.3390/ijms21124477.
- [51] L. N. Zhao, H. W. Long, Y. Mu, i L. Y. Chew, „The Toxicity of Amyloid  $\beta$  Oligomers”, *IJMS*, t. 13, nr 6, s. 7303–7327, cze. 2012, doi: 10.3390/ijms13067303.
- [52] E. P. Peter S. Eriksson, „Neurogenesis in the adult human hippocampus | Nature Medicine”, 1998. [https://www.nature.com/articles/nm1198\\_1313](https://www.nature.com/articles/nm1198_1313) (dostęp 26 czerwiec 2022).
- [53] M. Respondek i E. Buszman, „Regulacja procesu neurogenezy: czynniki wpływające na powstawanie nowych komórek nerwowych w mózgu dorosłych ssaków”, *Postepy Hig Med Dosw*, s. 11, 2015.
- [54] E. Gould, „How widespread is adult neurogenesis in mammals?”, *Nat Rev Neurosci*, t. 8, nr 6, s. 481–488, cze. 2007, doi: 10.1038/nrn2147.
- [55] A. Kumar, V. Pareek, M. A. Faiq, S. K. Ghosh, i C. Kumari, „ADULT NEUROGENESIS IN HUMANS: A Review of Basic Concepts, History, Current Research, and Clinical Implications”, *Innov Clin Neurosci*, t. 16, nr 5–6, s. 30–37, maj 2019.
- [56] M. V. Niklison-Chirou, M. Agostini, I. Amelio, i G. Melino, „Regulation of Adult Neurogenesis in Mammalian Brain”, *International Journal of Molecular Sciences*, t. 21, nr 14, Art. nr 14, sty. 2020, doi: 10.3390/ijms21144869.
- [57] V. V. Gusel'nikova i D. E. Korzhevskiy, „NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker”, *Acta Naturae*, t. 7, nr 2, s. 42–47, cze. 2015, doi: 10.32607/20758251-2015-7-2-42-47.
- [58] D. E. Korzhevskii, M. N. Karpenko, i O. V. Kirik, „Microtubule-Associated Proteins as Indicators of Differentiation and the Functional State of Nerve Cells”, *Neurosci Behav Physi*, t. 42, nr 3, s. 215–222, mar. 2012, doi: 10.1007/s11055-012-9556-4.
- [59] F. J. Mirza i S. Zahid, „The Role of Synapsins in Neurological Disorders”, *Neurosci. Bull.*, t. 34, nr 2, s. 349–358, kwi. 2018, doi: 10.1007/s12264-017-0201-7.
- [60] C. Zhao, W. Deng, i F. H. Gage, „Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis”, *Cell*, t. 132, nr 4, s. 645–660, luty 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.01.033.
- [61] D. T. Balu i I. Lucki, „Adult hippocampal neurogenesis: Regulation, functional implications, and contribution to disease pathology”, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, t. 33, nr 3, s. 232–252, mar. 2009, doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.08.007.
- [62] D. M. Feliciano, A. Bordey, i L. Bonfanti, „Noncanonical Sites of Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain”, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, t. 7, nr 10, s. a018846, paź. 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a018846.
- [63] M. Vilar i H. Mira, „Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles”, *Frontiers in Neuroscience*, t. 10, 2016, Dostęp: 13 sierpień 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2016.00026>
- [64] M. A. Al-Qudah i A. Al-Dwairi, „Mechanisms and regulation of neurotrophin synthesis and secretion”, *Neurosciences (Riyadh)*, t. 21, nr 4, s. 306–313, paź. 2016, doi: 10.17712/nsj.2016.4.20160080.
- [65] E. J. Huang i L. F. Reichardt, „Neurotrophins: roles in neuronal development and function”, *Annu Rev Neurosci*, t. 24, s. 677–736, 2001, doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.677.



- [66] M. Notaras i M. van den Buuse, „Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF): Novel Insights into Regulation and Genetic Variation”, *Neuroscientist*, t. 25, nr 5, s. 434–454, paź. 2019, doi: 10.1177/1073858418810142.
- [67] B. Machaliński, P. Łażewski-Banaszak, E. Dąbkowska, E. Paczkowska, M. Gołąb-Janowska, i P. Nowacki, „The role of neurotrophic factors in regeneration of the nervous system”, *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, t. 46, nr 6, Art. nr 6, 2012, doi: 10.5114/ninp.2012.32354.
- [68] L. F. Reichardt, „Neurotrophin-regulated signalling pathways”, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, t. 361, nr 1473, s. 1545–1564, wrz. 2006, doi: 10.1098/rstb.2006.1894.
- [69] R. Almeida i C. Duarte, „p75<sup>NTR</sup> Processing and Signaling: Functional Role”, 2014, s. 1899–1923. doi: 10.1007/978-1-4614-5836-4\_25.
- [70] Y. A. Barde, D. Edgar, i H. Thoenen, „Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain.”, *EMBO J*, t. 1, nr 5, s. 549–553, 1982.
- [71] I. M. Hanson, A. Seawright, i V. van Heyningen, „The human BDNF gene maps between FSHB and HVBS1 at the boundary of 11p13-p14”, *Genomics*, t. 13, nr 4, s. 1331–1333, sie. 1992, doi: 10.1016/0888-7543(92)90060-6.
- [72] P. C. Maisonpierre, Le Beau, M. M., Espinosa, R., 3rd, Ip, N. Y., Belluscio, L., de la Monte, S. M., Squinto, S., Furth, M. E., & Yancopoulos, G. D., „Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations”, *Genomics*, t. 10, nr 3, s. 558–568, lip. 1991, doi: 10.1016/0888-7543(91)90436-i.
- [73] P. Pruunsild, A. Kazantseva, T. Aid, K. Palm, i T. Timmusk, „Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters”, *Genomics*, t. 90, nr 3, s. 397–406, wrz. 2007, doi: 10.1016/j.ygeno.2007.05.004.
- [74] A. Cattaneo, N. Cattane, V. Begni, C. M. Pariante, i M. A. Riva, „The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders”, *Transl Psychiatry*, t. 6, nr 11, s. e958, lis. 2016, doi: 10.1038/tp.2016.214.
- [75] K. M. O’Neill, K. E. Donohue, A. Omelchenko, i B. L. Firestein, „The 3’ UTRs of Brain-Derived Neurotrophic Factor Transcripts Differentially Regulate the Dendritic Arbor”, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, t. 12, 2018, Dostęp: 5 wrzesień 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2018.00060>
- [76] F. Zheng, X. Zhou, C. Moon, i H. Wang, „Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons”, *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, t. 4, nr 4, s. 188–200, 2012.
- [77] N. Adachi, T. Numakawa, M. Richards, S. Nakajima, i H. Kunugi, „New insight in expression, transport, and secretion of brain-derived neurotrophic factor: Implications in brain-related diseases”, *World J Biol Chem*, t. 5, nr 4, s. 409–428, lis. 2014, doi: 10.4331/wjbc.v5.i4.409.
- [78] S. Bathina i U. N. Das, „Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications”, *Arch Med Sci*, t. 11, nr 6, s. 1164–1178, grudz. 2015, doi: 10.5114/aoms.2015.56342.
- [79] A. G. Lau, Irier, H. A., Gu, J., Tian, D., Ku, L., Liu, G., Xia, M., Fritsch, B., Zheng, J. Q., Dingledine, R., Xu, B., Lu, B., & Feng, Y., „Distinct 3’UTRs differentially regulate activity-dependent translation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, t. 107, nr 36, s. 15945–15950, wrz. 2010, doi: 10.1073/pnas.1002929107.
- [80] S. J. Mowla, Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G., & Murphy, R. A., „Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor”, *J Biol Chem*, t. 276, nr 16, s. 12660–12666, kwi. 2001, doi: 10.1074/jbc.M008104200.
- [81] L. Colucci-D’Amato, L. Speranza, i F. Volpicelli, „Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer”, *Int J Mol Sci*, t. 21, nr 20, s. E7777, paź. 2020, doi: 10.3390/ijms21207777.
- [82] M. E. Greenberg, B. Xu, B. Lu, i B. L. Hempstead, „New Insights in the Biology of BDNF Synthesis and Release: Implications in CNS Function”, *J Neurosci*, t. 29, nr 41, s. 12764–12767, paź. 2009, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3566-09.2009.
- [83] P. Kowiański, G. Lietzau, E. Czuba, M. Waśkow, A. Steliga, i J. Moryś, „BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity”, *Cell Mol Neurobiol*, t. 38, nr 3, s. 579–593, kwi. 2018, doi: 10.1007/s10571-017-0510-4.
- [84] J. J. Hwang, M.-H. Park, S.-Y. Choi, i J.-Y. Koh, „Activation of the Trk signaling pathway by extracellular zinc. Role of metalloproteinases”, *J Biol Chem*, t. 280, nr 12, s. 11995–12001, mar. 2005, doi: 10.1074/jbc.M403172200.

- [85] P. T. Pang, Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K. K., Yung, W. H., Hempstead, B. L., & Lu, B. „Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity”, *Science*, t. 306, nr 5695, s. 487–491, paź. 2004, doi: 10.1126/science.1100135.
- [86] C. A. Szarowicz, K. Steece-Collier, i M. E. Caulfield, „New Frontiers in Neurodegeneration and Regeneration Associated with Brain-Derived Neurotrophic Factor and the rs6265 Single Nucleotide Polymorphism”, *Int J Mol Sci*, t. 23, nr 14, s. 8011, lip. 2022, doi: 10.3390/ijms23148011.
- [87] W. Kazana i A. Zabłocka, „Czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego jako potencjalne narzędzie terapeutyczne w leczeniu schorzeń układu nerwowego”, *Postepy Hig Med Dosw*, t. 74, s. 517–531, grudz. 2020, doi: 10.5604/01.3001.0014.5678.
- [88] Z.-Y. Chen, Ieraci, A., Teng, H., Dall, H., Meng, C.-X., Herrera, D. G., Nykjaer, A., Hempstead, B. L., & Lee, F. S. „Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway”, *J Neurosci*, t. 25, nr 26, s. 6156–6166, cze. 2005, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1017-05.2005.
- [89] H. Lou, S.-K. Kim, E. Zaitsev, C. R. Snell, B. Lu, i Y. P. Loh, „Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase e”, *Neuron*, t. 45, nr 2, s. 245–255, sty. 2005, doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.037.
- [90] B. Lu, P. T. Pang, i N. H. Woo, „The yin and yang of neurotrophin action”, *Nat Rev Neurosci*, t. 6, nr 8, s. 603–614, sie. 2005, doi: 10.1038/nrn1726.
- [91] C. Cunha, R. Brambilla, i K. L. Thomas, „A Simple Role for BDNF in Learning and Memory?”, *Front Mol Neurosci*, t. 3, s. 1, luty 2010, doi: 10.3389/neuro.02.001.2010.
- [92] G. Tejeda i M. Díaz-Guerra, „Integral Characterization of Defective BDNF/TrkB Signalling in Neurological and Psychiatric Disorders Leads the Way to New Therapies”, *IJMS*, t. 18, nr 2, s. 268, sty. 2017, doi: 10.3390/ijms18020268.
- [93] M. A. De la Cruz-Morcillo i in., „p75 neurotrophin receptor and pro-BDNF promote cell survival and migration in clear cell renal cell carcinoma”, *Oncotarget*, t. 7, nr 23, s. 34480–34497, cze. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.8911.
- [94] Y. Sun, Lim, Y., Li, F., Liu, S., Lu, J.-J., Haberberger, R., Zhong, J.-H., & Zhou, X.-F. „ProBDNF collapses neurite outgrowth of primary neurons by activating RhoA”, *PLoS One*, t. 7, nr 4, s. e35883, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0035883.
- [95] B. Yang, L. Wang, Y. Nie, W. Wei, i W. Xiong, „proBDNF expression induces apoptosis and inhibits synaptic regeneration by regulating the RhoA-JNK pathway in an in vitro post-stroke depression model”, *Transl Psychiatry*, t. 11, nr 1, Art. nr 1, lis. 2021, doi: 10.1038/s41398-021-01667-2.
- [96] N. H. Woo, Teng, H. K., Siao, C. J., Chiaruttini, C., Pang, P. T., Milner, T. A., Hempstead, B. L., & Lu, B. „Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression”, *Nat Neurosci*, t. 8, nr 8, s. 1069–1077, sie. 2005, doi: 10.1038/nn1510.
- [97] K. Ohira i M. Hayashi, „A New Aspect of the TrkB Signaling Pathway in Neural Plasticity”, *CN*, t. 7, nr 4, s. 276–285, grudz. 2009, doi: 10.2174/157015909790031210.
- [98] F. F. Ferreira, F. F. Ribeiro, R. S. Rodrigues, A. M. Sebastião, i S. Xapelli, „Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Role in Cannabinoid-Mediated Neurogenesis”, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, t. 12, 2018, Dostęp: 6 wrzesień 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2018.00441>
- [99] Y. Ji, Lu, Y., Yang, F., Shen, W., Tang, T. T., Feng, L., Duan, S., & Lu, B. „Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in hippocampal neurons”, *Nat Neurosci*, t. 13, nr 3, s. 302–309, mar. 2010, doi: 10.1038/nn.2505.
- [100] T. Sonoyama, Stadler, L. K. J., Zhu, M., Keogh, J. M., Henning, E., Hisama, F., Kirwan, P., Jura, M., Blaszczyk, B. K., DeWitt, D. C., Brouwers, B., Hyvönen, M., Barroso, I., Merkle, F. T., Appleyard, S. M., Wayman, G. A., & Farooqi, I. S. „Human BDNF/TrkB variants impair hippocampal synaptogenesis and associate with neurobehavioural abnormalities”, *Sci Rep*, t. 10, s. 9028, cze. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-65531-x.
- [101] M. Baydyuk, Y. Xie, L. Tessarollo, i B. Xu, „Midbrain-Derived Neurotrophins Support Survival of Immature Striatal Projection Neurons”, *J Neurosci*, t. 33, nr 8, s. 3363–3369, luty 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3687-12.2013.
- [102] G. Leal, D. Comprido, i C. B. Duarte, „BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity”, *Neuropharmacology*, t. 76, s. 639–656, sty. 2014, doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.005.
- [103] M. Kwon, J. R. Fernández, G. F. Zegarek, S. B. Lo, i B. L. Firestein, „BDNF-Promoted Increases in Proximal Dendrites Occur via CREB-Dependent Transcriptional Regulation of Cypin”, *J. Neurosci.*, t. 31, nr 26, s. 9735–9745, cze. 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.6785-10.2011.

- [104] A. Arias-Cavieres, T. Adasme, G. Sánchez, P. Muñoz, i C. Hidalgo, „Aging Impairs Hippocampal-Dependent Recognition Memory and LTP and Prevents the Associated RyR Up-regulation”, *Frontiers in Aging Neuroscience*, t. 9, 2017, Dostęp: 7 wrzesień 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2017.00111>
- [105] C. S. Rex, Lauterborn, J. C., Lin, C. Y., Kramár, E. A., Rogers, G. A., Gall, C. M., & Lynch, G. „Restoration of Long-Term Potentiation in Middle-Aged Hippocampus After Induction of Brain-Derived Neurotrophic Factor”, *J Neurophysiol*, t. 96, nr 2, s. 677–685, sie. 2006, doi: 10.1152/jn.00336.2006.
- [106] G. P. Cortese, R. M. Barrientos, S. F. Maier, i S. L. Patterson, „Aging and a Peripheral Immune Challenge Interact to Reduce Mature Brain-Derived Neurotrophic Factor and Activation of TrkB, PLC 1, and ERK in Hippocampal Synaptoneuroosomes”, *Journal of Neuroscience*, t. 31, nr 11, s. 4274–4279, mar. 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5818-10.2011.
- [107] A. F. Richwine, Parkin, A. O., Buchanan, J. B., Chen, J., Markham, J. A., Juraska, J. M., & Johnson, R. W. „Architectural changes to CA1 pyramidal neurons in adult and aged mice after peripheral immune stimulation”, *Psychoneuroendocrinology*, t. 33, nr 10, s. 1369–1377, lis. 2008, doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.08.003.
- [108] H. Shimada, Makizako, H., Doi, T., Yoshida, D., Tsutsumimoto, K., Anan, Y., Uemura, K., Lee, S., Park, H., & Suzuki, T. „A Large, Cross-Sectional Observational Study of Serum BDNF, Cognitive Function, and Mild Cognitive Impairment in the Elderly”, *Front Aging Neurosci*, t. 6, s. 69, kwi. 2014, doi: 10.3389/fnagi.2014.00069.
- [109] H. Oh, D. A. Lewis, i E. Sibille, „The Role of BDNF in Age-Dependent Changes of Excitatory and Inhibitory Synaptic Markers in the Human Prefrontal Cortex”, *Neuropsychopharmacol*, t. 41, nr 13, s. 3080–3091, grudz. 2016, doi: 10.1038/npp.2016.126.
- [110] M. Miranda, J. F. Morici, M. B. Zanoni, i P. Bekinschtein, „Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain”, *Front Cell Neurosci*, t. 13, s. 363, 2019, doi: 10.3389/fncel.2019.00363.
- [111] T. K. S. Ng, C. S. H. Ho, W. W. S. Tam, E. H. Kua, i R. C.-M. Ho, „Decreased Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels in Patients with Alzheimer’s Disease (AD): A Systematic Review and Meta-Analysis”, *Int J Mol Sci*, t. 20, nr 2, s. E257, sty. 2019, doi: 10.3390/ijms20020257.
- [112] C. Zuccato i E. Cattaneo, „Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington’s disease”, *Prog Neurobiol*, t. 81, nr 5–6, s. 294–330, kwi. 2007, doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.01.003.
- [113] C. Zuccato i E. Cattaneo, „Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases”, *Nat Rev Neurol*, t. 5, nr 6, s. 311–322, cze. 2009, doi: 10.1038/nrneurol.2009.54.
- [114] T. Kishi, R. Yoshimura, T. Ikuta, i N. Iwata, „Brain-Derived Neurotrophic Factor and Major Depressive Disorder: Evidence from Meta-Analyses”, *Front Psychiatry*, t. 8, s. 308, 2017, doi: 10.3389/fpsynt.2017.00308.
- [115] R. Nieto, M. Kukuljan, i H. Silva, „BDNF and schizophrenia: from neurodevelopment to neuronal plasticity, learning, and memory”, *Front Psychiatry*, t. 4, s. 45, 2013, doi: 10.3389/fpsynt.2013.00045.
- [116] W. R. Schäbitz, C. Sommer, W. Zoder, M. Kiessling, M. Schwaninger, i S. Schwab, „Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia”, *Stroke*, t. 31, nr 9, s. 2212–2217, wrz. 2000, doi: 10.1161/01.str.31.9.2212.
- [117] D. Zala, Benchoua, A., Brouillet, E., Perrin, V., Gaillard, M. C., Zurn, A. D., Aebischer, P., & Déglon, N. „Progressive and selective striatal degeneration in primary neuronal cultures using lentiviral vector coding for a mutant huntingtin fragment”, *Neurobiol Dis*, t. 20, nr 3, s. 785–798, grudz. 2005, doi: 10.1016/j.nbd.2005.05.017.
- [118] N. D. Dey, Bombard, M. C., Roland, B. P., Davidson, S., Lu, M., Rossignol, J., Sandstrom, M. I., Skeel, R. L., Lescaudron, L., & Dunbar, G. L. „Genetically engineered mesenchymal stem cells reduce behavioral deficits in the YAC 128 mouse model of Huntington’s disease”, *Behavioural Brain Research*, t. 214, nr 2, s. 193–200, grudz. 2010, doi: 10.1016/j.bbr.2010.05.023.
- [119] K. Pollock, Dahlenburg, H., Nelson, H., Fink, K. D., Cary, W., Hendrix, K., Annett, G., Torrest, A., Deng, P., Gutierrez, J., Nacey, C., Pepper, K., Kalomoiris, S., D Anderson, J., McGee, J., Gruenloh, W., Fury, et al. „Human Mesenchymal Stem Cells Genetically Engineered to Overexpress Brain-derived Neurotrophic Factor Improve Outcomes in Huntington’s Disease Mouse Models”, *Mol Ther*, t. 24, nr 5, s. 965–977, maj 2016, doi: 10.1038/mt.2016.12.
- [120] S.-W. Jang, Liu, X., Yepes, M., Shepherd, K. R., Miller, G. W., Liu, Y., Wilson, W. D., Xiao, G., Blanchi, B., Sun, Y. E., & Ye, K. „A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-

- dihydroxyflavone”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, t. 107, nr 6, s. 2687–2692, luty 2010, doi: 10.1073/pnas.0913572107.
- [121] S. M. Massa, Yang, T., Xie, Y., Shi, J., Bilgen, M., Joyce, J. N., Nehama, D., Rajadas, J., & Longo, F. M. „Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents”, *J Clin Invest*, t. 120, nr 5, s. 1774–1785, maj 2010, doi: 10.1172/JCI41356.
- [122] S. Merkouris, Barde YA, Binley KE, Allen ND, Stepanov AV, Wu NC, Grande G, Lin CW, Li M, Nan X, Chacon-Fernandez P, DiStefano PS, Lindsay RM, Lerner RA, Xie J. „Fully human agonist antibodies to TrkB using autocrine cell-based selection from a combinatorial antibody library”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, t. 115, nr 30, s. E7023–E7032, lip. 2018, doi: 10.1073/pnas.1806660115.
- [123] D. Todd, Gowers, I., Dowler, S. J., Wall, M. D., McAllister, G., Fischer, D. F., Dijkstra, S., Fratantoni, S. A., van de Bospoort, R., Veenman-Koepke, J., Flynn, G., Arjomand, J., Dominguez, C., Munoz-Sanjuan, I., Wityak, J., & Bard, J. A. „A monoclonal antibody TrkB receptor agonist as a potential therapeutic for Huntington’s disease”, *PLoS One*, t. 9, nr 2, s. e87923, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0087923.
- [124] A. N. Edelbrock, Álvarez, Z., Simkin, D., Fyrner, T., Chin, S. M., Sato, K., Kiskinis, E., & Stupp, S. I. „Supramolecular Nanostructure Activates TrkB Receptor Signaling of Neuronal Cells by Mimicking Brain-Derived Neurotrophic Factor”, *Nano Lett*, t. 18, nr 10, s. 6237–6247, paź. 2018, doi: 10.1021/acs.nanolett.8b02317.
- [125] J. L. Fletcher, Wood, R. J., Nguyen, J., Norman, E. M. L., Jun, C. M. K., Prawdiuk, A. R., Biemond, M., Nguyen, H. T. H., Northfield, S. E., Hughes, R. A., Gonsalvez, D. G., Xiao, J., & Murray, S. S. „Targeting TrkB with a Brain-Derived Neurotrophic Factor Mimetic Promotes Myelin Repair in the Brain”, *J Neurosci*, t. 38, nr 32, s. 7088–7099, sie. 2018, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0487-18.2018.
- [126] Y. Xu, Ku, B., Tie, L., Yao, H., Jiang, W., Ma, X., & Li, X. „Curcumin reverses the effects of chronic stress on behavior, the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of CREB”, *Brain Res*, t. 1122, nr 1, s. 56–64, lis. 2006, doi: 10.1016/j.brainres.2006.09.009.
- [127] S. Moghbelinejad, Nassiri-Asl, M., Farivar, T. N., Abbasi, E., Sheikhi, M., Taghiloo, M., Farsad, F., Samimi, A., & Hajiali, F. „Rutin activates the MAPK pathway and BDNF gene expression on beta-amyloid induced neurotoxicity in rats”, *Toxicol Lett*, t. 224, nr 1, s. 108–113, sty. 2014, doi: 10.1016/j.toxlet.2013.10.010.
- [128] A. A. Fonteles, de Souza, C. M., de Sousa Neves, J. C., Menezes, A. P., Santos do Carmo, M. R., Fernandes, F. D., de Araújo, P. R., & de Andrade, G. M. „Rosmarinic acid prevents against memory deficits in ischemic mice”, *Behavioural Brain Research SreeTestContent1*, t. 297, s. 91–103, sty. 2016, doi: 10.1016/j.bbr.2015.09.029.
- [129] H. Wang, J. Xu, P. Lazarovici, R. Quirion, i W. Zheng, „cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia”, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, t. 11, 2018, Dostęp: 2 sierpień 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00255>
- [130] Y. H. Belgacem i L. N. Borodinsky, *The Plastic Brain | SpringerLink*, t. 1015. Springer Cham, 2017. Dostęp: 3 sierpień 2022. [Online]. Dostępne na: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-62817-2>
- [131] S. Ortega-Martínez „A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis”, *Front Mol Neurosci*, t. 8, s. 46, 2015, doi: 10.3389/fnmol.2015.00046.
- [132] Y. Yan i M. A. Clements, *CREB: STRUCTURE, FUNCTIONS, AND ROLE IN DISEASE*. In: Leon V. Berhardt (Ed.) *Advances in Medicine and Biology* (s.81-134), Nova Science Publishers, 2020.
- [133] C. M. Alberini, „Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity”, *Physiological Reviews*, t. 89, nr 1, s. 121–145, sty. 2009, doi: 10.1152/physrev.00017.2008.
- [134] E.-E. Esvald, J. Tuvikene, A. Sirp, S. Patil, C. R. Bramham, i T. Timmusk, „CREB Family Transcription Factors Are Major Mediators of BDNF Transcriptional Autoregulation in Cortical Neurons”, *J Neurosci*, t. 40, nr 7, s. 1405–1426, luty 2020, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0367-19.2019.
- [135] M. R. Montminy i L. M. Bilezikjian, „Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene”, *Nature*, t. 328, nr 6126, s. 175–178, lip. 1987, doi: 10.1038/328175a0.
- [136] X. Zhang, Odom, D. T., Koo, S. H., Conkright, M. D., Canettieri, G., Best, J., Chen, H., Jenner, R., Herbolsheimer, E., Jacobsen, E., Kadam, S., Ecker, J. R., Emerson, B., Hogenesch, J. B., Unterman, T., Young, R. A., & Montminy, M. „Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, t. 102, nr 12, s. 4459–4464, mar. 2005, doi: 10.1073/pnas.0501076102.

- [137] J. Zhang, C.-Y. Cai, H.-Y. Wu, L.-J. Zhu, C.-X. Luo, i D.-Y. Zhu, „CREB-mediated synaptogenesis and neurogenesis is crucial for the role of 5-HT1a receptors in modulating anxiety behaviors”, *Sci Rep*, t. 6, nr 1, Art. nr 1, lip. 2016, doi: 10.1038/srep29551.
- [138] B. S. Landeira, Santana TTDS, Araújo JAM, Tabet EI, Tannous BA, Schroeder T, Costa MR. „Activity-Independent Effects of CREB on Neuronal Survival and Differentiation during Mouse Cerebral Cortex Development”, *Cereb Cortex*, t. 28, nr 2, s. 538–548, luty 2018, doi: 10.1093/cercor/bhw387.
- [139] D. Gandolfi, Cerri, S., Mapelli, J., Polimeni, M., Tritto, S., Fuzzati-Armentero, M. T., Bigiani, A., Blandini, F., Mapelli, L., & D'Angelo, E. „Activation of the CREB/c-Fos Pathway during Long-Term Synaptic Plasticity in the Cerebellum Granular Layer”, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, t. 11, 2017, Dostęp: 13 wrzesień 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2017.00184>
- [140] S. Kida, „A Functional Role for CREB as a Positive Regulator of Memory Formation and LTP”, *Exp Neurol*, t. 21, nr 4, s. 136–140, grudz. 2012, doi: 10.5607/en.2012.21.4.136.
- [141] L. Morè, Privitera, L., Perrett, P., Cooper, D. D., Bonnello, M. V. G., Arthur, J. S. C., & Frenguelli, B. G. „CREB serine 133 is necessary for spatial cognitive flexibility and long-term potentiation”, *Neuropharmacology*, s. 109237, sie. 2022, doi: 10.1016/j.neuropharm.2022.109237.
- [142] H. Zhang, Q. Kong, J. Wang, Y. Jiang, i H. Hua, „Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer”, *Exp Hematol Oncol*, t. 9, nr 1, s. 32, lis. 2020, doi: 10.1186/s40164-020-00191-1.
- [143] E. J. Kodis, Privitera, L., Perrett, P., Cooper, D. D., Bonnello, M. V. G., Arthur, J. S. C., & Frenguelli, B. G. „First Messengers”, w *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, 2012. doi: 10.1002/9780470015902.a0024167.
- [144] F. Murad, „Nitric Oxide: The Coming of the Second Messenger”, *Rambam Maimonides Med J*, t. 2, nr 2, s. e0038, kwi. 2011, doi: 10.5041/RMMJ.10038.
- [145] A. C. Newton, M. D. Bootman, i J. D. Scott, „Second Messengers”, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, t. 8, nr 8, s. a005926, sie. 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a005926.
- [146] J.-P. Vilardaga, F. G. Jean-Alphonse, i T. J. Gardella, „Endosomal generation of cAMP in GPCR signaling”, *Nat Chem Biol*, t. 10, nr 9, s. 700–706, wrz. 2014.
- [147] T. Boczek, Cameron, E. G., Yu, W., Xia, X., Shah, S. H., Castillo Chabeco, B., Galvao, J., Nahmou, M., Li, J., Thakur, H., Goldberg, J. L., & Kapiloff, M. S. „Regulation of Neuronal Survival and Axon Growth by a Perinuclear cAMP Compartment”, *J. Neurosci.*, t. 39, nr 28, s. 5466–5480, lip. 2019, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2752-18.2019.
- [148] C. Inda, Bonfiglio, J. J., Dos Santos Claro, P. A., Senin, S. A., Armando, N. G., Deussing, J. M., & Silberstein, S. „cAMP-dependent cell differentiation triggered by activated CRHR1 in hippocampal neuronal cells”, *Sci Rep*, t. 7, nr 1, Art. nr 1, maj 2017, doi: 10.1038/s41598-017-02021-7.
- [149] T. L. Stiles, M. S. Kapiloff, i J. L. Goldberg, „The role of soluble adenylyl cyclase in neurite outgrowth”, *Biochim Biophys Acta*, t. 1842, nr 0, s. 2561–2568, grudz. 2014, doi: 10.1016/j.bbadis.2014.07.012.
- [150] M. Tresguerres, L. R. Levin, i J. Buck, „Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase”, *Kidney International*, t. 79, nr 12, s. 1277–1288, cze. 2011, doi: 10.1038/ki.2011.95.
- [151] K. Omori i J. Kotera, „Overview of PDEs and Their Regulation”, *Circulation Research*, t. 100, nr 3, s. 309–327, luty 2007, doi: 10.1161/01.RES.0000256354.95791.f1.
- [152] K. Devasani i Y. Yao, „Expression and functions of adenylyl cyclases in the CNS”, *Fluids Barriers CNS*, t. 19, nr 1, s. 23, mar. 2022, doi: 10.1186/s12987-022-00322-2.
- [153] A. A. Oliva, Jr, Kang, Y., Furones, C., Alonso, O. F., Bruno, O., Dietrich, W. D., & Atkins, C. M. „Phosphodiesterase isoform-specific expression induced by traumatic brain injury”, *J Neurochem*, t. 123, nr 6, s. 1019–1029, grudz. 2012, doi: 10.1111/jnc.12049.
- [154] P. Sassone-Corsi, „The Cyclic AMP Pathway”, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, t. 4, nr 12, s. a011148–a011148, grudz. 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a011148.
- [155] W. G. Robichaux i X. Cheng, „Intracellular cAMP Sensor EPAC: Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics Development”, *Physiol Rev*, t. 98, nr 2, s. 919–1053, kwi. 2018, doi: 10.1152/physrev.00025.2017.
- [156] K. Lee, „Epac: new emerging cAMP-binding protein”, *BMB Rep*, t. 54, nr 3, s. 149–156, mar. 2021.
- [157] M. Biel i S. Michalakis, „Cyclic Nucleotide-Gated Channels”, w *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications*, t. 191, H. H. H. W. Schmidt, F. Hofmann, i J.-P. Stasch, Red. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, s. 111–136. doi: 10.1007/978-3-540-68964-5\_7.
- [158] W. Ma i G. A. Berkowitz, „Cyclic Nucleotide Gated Channels (CNGCs) and the Generation of Ca<sup>2+</sup> Signals”, w *Coding and Decoding of Calcium Signals in Plants*, S. Luan, Red. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, s. 93–110. doi: 10.1007/978-3-642-20829-4\_7.

- [159] K. Taskén, Skálhegg, B. S., Solberg, R., Andersson, K. B., Taylor, S. S., Lea, T., Blomhoff, H. K., Jahnsen, T., & Hansson, V. „Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes.”, *Journal of Biological Chemistry*, t. 268, nr 28, s. 21276–21283, paź. 1993, doi: 10.1016/S0021-9258(19)36921-2.
- [160] L. R. Pearce, D. Komander, i D. R. Alessi, „The nuts and bolts of AGC protein kinases”, *Nat Rev Mol Cell Biol*, t. 11, nr 1, Art. nr 1, sty. 2010, doi: 10.1038/nrm2822.
- [161] R. K. Dagda i T. D. Banerjee, „Role of PKA in regulating mitochondrial function and neuronal development: implications to neurodegenerative diseases”, *Rev Neurosci*, t. 26, nr 3, s. 359–370, cze. 2015, doi: 10.1515/revneuro-2014-0085.
- [162] A. B. Toth, A. K. Shum, i M. Prakriya, „Regulation of neurogenesis by calcium signaling”, *Cell Calcium*, t. 59, nr 2–3, s. 124–134, mar. 2016, doi: 10.1016/j.ceca.2016.02.011.
- [163] P. Marambaud, U. Dreses-Werringloer, i V. Vingtdeux, „Calcium signaling in neurodegeneration”, *Molecular Neurodegeneration*, t. 4, nr 1, s. 20, maj 2009, doi: 10.1186/1750-1326-4-20.
- [164] A. E. West, Chen, W. G., Dalva, M. B., Dolmetsch, R. E., Kornhauser, J. M., Shaywitz, A. J., Takasu, M. A., Tao, X., & Greenberg, M. E. „Calcium regulation of neuronal gene expression”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, t. 98, nr 20, s. 11024–11031, wrz. 2001, doi: 10.1073/pnas.191352298.
- [165] X. Yan, Liu, J., Ye, Z., Huang, J., He, F., Xiao, W., Hu, X., & Luo, Z. „CaMKII-Mediated CREB Phosphorylation Is Involved in Ca<sup>2+</sup>-Induced BDNF mRNA Transcription and Neurite Outgrowth Promoted by Electrical Stimulation”, *PLoS ONE*, t. 11, nr 9, s. e0162784, wrz. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0162784.
- [166] Z. P. Pang i T. C. Südhof, „Cell biology of Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis”, *Current Opinion in Cell Biology*, t. 22, nr 4, s. 496–505, sie. 2010, doi: 10.1016/j.ceb.2010.05.001.
- [167] R. Jahn i D. Fasshauer, „Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles”, *Nature*, t. 490, nr 7419, Art. nr 7419, paź. 2012, doi: 10.1038/nature11320.
- [168] T. Brigadski i V. Leßmann, „The physiology of regulated BDNF release”, *Cell Tissue Res*, t. 382, nr 1, s. 15–45, paź. 2020, doi: 10.1007/s00441-020-03253-2.
- [169] K. Sánchez-Alegría, M. Flores-León, E. Avila-Muñoz, N. Rodríguez-Corona, i C. Arias, „PI3K Signaling in Neurons: A Central Node for the Control of Multiple Functions”, *Int J Mol Sci*, t. 19, nr 12, s. E3725, lis. 2018, doi: 10.3390/ijms19123725.
- [170] X. Shi, J. Wang, Y. Lei, C. Cong, D. Tan, i X. Zhou, „Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer (Review)”, *Molecular Medicine Reports*, t. 19, nr 6, s. 4529–4535, cze. 2019, doi: 10.3892/mmr.2019.10121.
- [171] J. S. L. Yu i W. Cui, „Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination”, *Development*, t. 143, nr 17, s. 3050–3060, wrz. 2016, doi: 10.1242/dev.137075.
- [172] J. Pearson-Leary, V. Jahagirdar, J. Sage, i E. C. McNay, „Insulin modulates hippocampally-mediated spatial working memory via glucose transporter-4”, *Behav Brain Res*, t. 338, s. 32–39, luty 2018, doi: 10.1016/j.bbr.2017.09.033.
- [173] S. L. Pompura i M. Dominguez-Villar, „The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function”, *J Leukoc Biol*, sty. 2018, doi: 10.1002/JLB.2MIR0817-349R.
- [174] X. He, Li, Y., Deng, B., Lin, A., Zhang, G., Ma, M., Wang, Y., Yang, Y., & Kang, X. „The PI3K/AKT signalling pathway in inflammation, cell death and glial scar formation after traumatic spinal cord injury: Mechanisms and therapeutic opportunities”, *Cell Proliferation*, t. 55, nr 9, s. e13275, 2022, doi: 10.1111/cpr.13275.
- [175] A. G. Batrouni i J. M. Baskin, „A MAP for PI3K activation on endosomes”, *Nat Cell Biol*, t. 22, nr 11, Art. nr 11, lis. 2020, doi: 10.1038/s41556-020-00597-3.
- [176] A. Iershov, Nemazanyy, I., Alkhoury, C., Girard, M., Barth, E., Cagnard, N., Montagner, A., Chretien, D., Rugarli, E. I., Guillou, H., Pende, M., & Panasyuk, G. „The class 3 PI3K coordinates autophagy and mitochondrial lipid catabolism by controlling nuclear receptor PPAR $\alpha$ ”, *Nat Commun*, t. 10, nr 1, Art. nr 1, kwi. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09598-9.
- [177] H.-Z. Long, Y. Cheng, Z.-W. Zhou, H.-Y. Luo, D.-D. Wen, i L.-C. Gao, „PI3K/AKT Signal Pathway: A Target of Natural Products in the Prevention and Treatment of Alzheimer’s Disease and Parkinson’s Disease”, *Front. Pharmacol.*, t. 12, s. 648636, kwi. 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.648636.
- [178] S. A. Santi, A. C. Douglas, i H. Lee, „The Akt isoforms, their unique functions and potential as anticancer therapeutic targets”, t. 1, nr 5–6, s. 389–401, grudz. 2010, doi: 10.1515/bmc.2010.035.
- [179] D. A. Fruman, H. Chiu, B. D. Hopkins, S. Bagrodia, L. C. Cantley, i R. T. Abraham, „The PI3K Pathway in Human Disease”, *Cell*, t. 170, nr 4, s. 605–635, sie. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.07.029.

- [180] K. Tsirtsaki i V. Gkretsi, „The focal adhesion protein Integrin-Linked Kinase (ILK) as an important player in breast cancer pathogenesis”, *Cell Adh Migr*, t. 14, nr 1, s. 204–213, grudz. 2020, doi: 10.1080/19336918.2020.1829263.
- [181] Y. Tu, Ji, C., Yang, B., Yang, Z., Gu, H., Lu, C. C., Wang, R., Su, Z. L., Chen, B., Sun, W. L., Xia, J. P., Bi, Z. G., & He, L. „DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs)-SIN1 association mediates ultraviolet B (UVB)-induced Akt Ser-473 phosphorylation and skin cell survival”, *Mol Cancer*, t. 12, s. 172, grudz. 2013, doi: 10.1186/1476-4598-12-172.
- [182] Y. Dong, K. Pu, W. Duan, H. Chen, L. Chen, i Y. Wang, „Involvement of Akt/CREB signaling pathways in the protective effect of EPA against interleukin-1 $\beta$ -induced cytotoxicity and BDNF down-regulation in cultured rat hippocampal neurons”, *BMC Neuroscience*, t. 19, nr 1, s. 52, wrz. 2018, doi: 10.1186/s12868-018-0455-7.
- [183] F. Farhat, S. Nofal, E. M. Raafat, i A. A. Eissa Ahmed, „Akt / GSK3 $\beta$  / Nrf2 / HO-1 pathway activation by flurbiprofen protects the hippocampal neurons in a rat model of glutamate excitotoxicity”, *Neuropharmacology*, t. 196, s. 108654, wrz. 2021, doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108654.
- [184] A. I. Rojo, M. Salinas, D. Martín, R. Perona, i A. Cuadrado, „Regulation of Cu/Zn-Superoxide Dismutase Expression via the Phosphatidylinositol 3 Kinase/Akt Pathway and Nuclear Factor- $\kappa$ B”, *J Neurosci*, t. 24, nr 33, s. 7324–7334, sie. 2004, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2111-04.2004.
- [185] I. Ferrara-Romeo, Martinez, P., Saraswati, S., Whittemore, K., Graña-Castro, O., Thelma Poluha, L., Serrano, R., Hernandez-Encinas, E., Blanco-Aparicio, C., Maria Flores, J., & Blasco, M. A. „The mTOR pathway is necessary for survival of mice with short telomeres”, *Nat Commun*, t. 11, nr 1, Art. nr 1, mar. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14962-1.
- [186] V. Ghiglieri, V. Pendolino, V. Bagetta, C. Sgobio, P. Calabresi, i B. Picconi, „mTOR inhibitor rapamycin suppresses striatal post-ischemic LTP”, *Experimental Neurology*, t. 226, nr 2, s. 328–331, grudz. 2010, doi: 10.1016/j.expneurol.2010.09.012.
- [187] R. Vartanian, Masri, J., Martin, J., Cloninger, C., Holmes, B., Artinian, N., Funk, A., Ruegg, T., & Gera, J. „AP-1 regulates cyclin D1 and c-MYC transcription in an AKT-dependent manner in response to mTOR inhibition: Role of AIP4/Itch-mediated JUNB degradation”, *Mol Cancer Res*, t. 9, nr 1, s. 115–130, sty. 2011, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0105.
- [188] B. Markman, R. Dienstmann, i J. Tabernero, „Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs”, *Oncotarget*, t. 1, nr 7, s. 530–543, lis. 2010, doi: 10.18632/oncotarget.101012.
- [189] X. Guo, W. D. Snider, i B. Chen, „GSK3 $\beta$  regulates AKT-induced central nervous system axon regeneration via an eIF2B $\epsilon$ -dependent, mTORC1-independent pathway”, *eLife*, t. 5, s. e11903, mar. 2016, doi: 10.7554/eLife.11903.
- [190] G. E. Saraceno, M. J. Bellini, L. M. Garcia-Segura, i F. Capani, „Estradiol Activates PI3K/Akt/GSK3 Pathway Under Chronic Neurodegenerative Conditions Triggered by Perinatal Asphyxia”, *Frontiers in Pharmacology*, t. 9, 2018, Dostęp: 16 wrzesień 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00335>
- [191] M. Cargnello i P. P. Roux, „Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases”, *Microbiol Mol Biol Rev*, t. 75, nr 1, s. 50–83, mar. 2011, doi: 10.1128/MMBR.00031-10.
- [192] C. Vaillancourt, D. Lanoix, F. Le Bellego, G. Daoud, i J. Lafond, „Involvement of MAPK signalling in human villous trophoblast differentiation”, *Mini Rev Med Chem*, t. 9, nr 8, s. 962–973, lip. 2009, doi: 10.2174/138955709788681663.
- [193] M. Krzyzowska, W. Swiatek, B. Fijalkowska, M. Niemialtowski, i A. Schollenberger, „Rola kinaz MAP w odpowiedzi immunologicznej”, *Postępy Biologii Komórki*, t. 36, nr 2, s. 295–308, 2009.
- [194] A. Tubita, I. Tusa, i E. Rovida, „Playing the Whack-A-Mole Game: ERK5 Activation Emerges Among the Resistance Mechanisms to RAF-MEK1/2-ERK1/2- Targeted Therapy”, *Front Cell Dev Biol*, t. 9, s. 647311, mar. 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.647311.
- [195] Y. Lee, Y. J. Kim, M.-H. Kim, i J. M. Kwak, „MAPK Cascades in Guard Cell Signal Transduction”, *Frontiers in Plant Science*, t. 7, 2016, Dostęp: 17 wrzesień 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00080>
- [196] B. Canovas i A. R. Nebreda, „Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease”, *Nat Rev Mol Cell Biol*, t. 22, nr 5, s. 346–366, maj 2021, doi: 10.1038/s41580-020-00322-w.
- [197] A. Zeke, M. Misheva, A. Reményi, i M. A. Bogoyevitch, „JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships”, *Microbiol Mol Biol Rev*, t. 80, nr 3, s. 793–835, wrz. 2016, doi: 10.1128/MMBR.00043-14.

- [198] N. D. Anfinogenova, M. T. Quinn, I. A. Schepetkin, i D. N. Atochin, „Alarmins and c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Signaling in Neuroinflammation”, *Cells*, t. 9, nr 11, s. E2350, paź. 2020, doi: 10.3390/cells9112350.
- [199] V. Waetzig, Y. Zhao, i T. Herdegen, „The bright side of JNKs—Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration”, *Progress in Neurobiology*, t. 80, nr 2, s. 84–97, paź. 2006, doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.08.002.
- [200] R. Yarza, S. Vela, M. Solas, i M. J. Ramirez, „c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling as a Therapeutic Target for Alzheimer’s Disease”, *Frontiers in Pharmacology*, t. 6, 2016, Dostęp: 17 wrzesień 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2015.00321>
- [201] P. R. Asih, E. Prikas, K. Stefanoska, A. R. P. Tan, H. I. Ahel, i A. Ittner, „Functions of p38 MAP Kinases in the Central Nervous System”, *Front Mol Neurosci*, t. 13, s. 570586, wrz. 2020, doi: 10.3389/fnmol.2020.570586.
- [202] P. R. Young, „Perspective on the Discovery and Scientific Impact of p38 MAP Kinase”, *SLAS Discovery*, t. 18, nr 10, s. 1156–1163, grudz. 2013, doi: 10.1177/1087057113497401.
- [203] N. Lu i C. J. Malemud, „Extracellular Signal-Regulated Kinase: A Regulator of Cell Growth, Inflammation, Chondrocyte and Bone Cell Receptor-Mediated Gene Expression”, *IJMS*, t. 20, nr 15, s. 3792, sie. 2019, doi: 10.3390/ijms20153792.
- [204] J. Sun i G. Nan, „The extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neurological diseases: A potential therapeutic target (Review)”, *Int J Mol Med*, t. 39, nr 6, s. 1338–1346, cze. 2017, doi: 10.3892/ijmm.2017.2962.
- [205] R. Roskoski, „ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation”, *Pharmacol Res*, t. 66, nr 2, s. 105–143, sie. 2012, doi: 10.1016/j.phrs.2012.04.005.
- [206] T. Trziszka i H. Różański, „Żywność funkcjonalna i nutraceutyki w profilaktyce chorób cywilizacyjnych”, *HERBALISM*, t. 1, nr 1, Art. nr 1, grudz. 2015, doi: 10.12775/HERB.2015.001.
- [207] S. DeFelice, „The nutraceutical initiative: a recommendation for use economic and regulatory reforms”, *Genetic Engineering News*, t. 12, s. 13–25, 1992.
- [208] M. Chmielewska, J. Tys, J. Petkowicz, i B. Petkowicz, „Food – first, to do no harm (a review)”, *Acta Agroph.*, t. 25, nr 1, s. 17–34, cze. 2018, doi: 10.31545/aagr0002.
- [209] V. Menon, „Nutrients and Nutraceuticals from Seafood”, w *Bioactive Molecules in Food*, J. Mérillon i K. Ramawat, Red. Springer Cham, 2021, s. 1–37.
- [210] N. Bharti, R. Kaur, i S. Kaur, „Health Benefits Of Probiotic Bacteria As Nutraceuticals”, *Clinical Medicine*, t. 07, nr 07, s. 11, 2020.
- [211] K. Pujer, *Problemy nauk medycznych i nauk o zdrowiu: monografia : praca zbiorowa. T. 1 T. 1.* Wrocław: Exante Wydawnictwo Naukowe Klaudia Pujer, 2017.
- [212] J. Kovacs-Nolan, M. Phillips, i Y. Mine, „Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health”, *J. Agric. Food Chem.*, t. 53, nr 22, s. 8421–8431, lis. 2005, doi: 10.1021/jf050964f.
- [213] S. Réhault-Godbert, N. Guyot, i Y. Nys, „The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health”, *Nutrients*, t. 11, nr 3, Art. nr 3, mar. 2019, doi: 10.3390/nu11030684.
- [214] E. T. M. Leermakers, Moreira, E. M., Kiefe-de Jong, J. C., Darweesh, S. K., Visser, T., Voortman, T., Bautista, P. K., Chowdhury, R., Gorman, D., Bramer, W. M., Felix, J. F., & Franco, O. H. „Effects of choline on health across the life course: a systematic review”, *Nutr Rev*, t. 73, nr 8, s. 500–522, sie. 2015, doi: 10.1093/nutrit/nuv010.
- [215] A. Wiedeman, S. Barr, T. Green, Z. Xu, S. Innis, i D. Kitts, „Dietary Choline Intake: Current State of Knowledge Across the Life Cycle”, *Nutrients*, t. 10, nr 10, s. 1513, paź. 2018, doi: 10.3390/nu10101513.
- [216] A. Murai, „Maternal Transfer of Immunoglobulins into Egg Yolks of Birds”, *J. Poult. Sci.*, t. 50, nr 3, s. 185–193, 2013, doi: 10.2141/jpsa.0120194.
- [217] C.-E. Karachaliou, V. Vassilakopoulou, i E. Livaniou, „IgY technology: Methods for developing and evaluating avian immunoglobulins for the in vitro detection of biomolecules”, *World J Methodol*, t. 11, nr 5, s. 243–262, wrz. 2021, doi: 10.5662/wjm.v11.i5.243.
- [218] E. P. V. Pereira, M. F. van Tilburg, E. O. P. T. Florean, i M. I. F. Guedes, „Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review”, *International Immunopharmacology*, t. 73, s. 293–303, sie. 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2019.05.015.
- [219] A. Polanowski, A. Zabłocka, A. Sosnowska, M. Janusz, i T. Trziszka, „Immunomodulatory activity accompanying chicken egg yolk immunoglobulin Y”, *Poult Sci*, t. 91, nr 12, s. 3091–3096, grudz. 2012, doi: 10.3382/ps.2012-02546.



- [220] A. Polanowski, A. Sosnowska, A. Zabłocka, M. Janusz, i T. Trziszka, „Immunologically active peptides that accompany hen egg yolk immunoglobulin Y: separation and identification”, *Biol Chem*, t. 394, nr 7, s. 879–887, lip. 2013, doi: 10.1515/hsz-2012-0337.
- [221] H. Li i S. Zhang, „Functions of Vitellogenin in Eggs”, *Results Probl Cell Differ*, t. 63, s. 389–401, 2017, doi: 10.1007/978-3-319-60855-6\_17.
- [222] R. N. Finn, „Vertebrate Yolk Complexes and the Functional Implications of Phosvitins and Other Subdomains in Vitellogenins<sup>1</sup>”, *Biology of Reproduction*, t. 76, nr 6, s. 926–935, cze. 2007, doi: 10.1095/biolreprod.106.059766.
- [223] The UniProt Consortium, „UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 | | Oxford Academic”, *Nucleic Acids Research*, t. 49, nr D1, s. D480–D489, 2021.
- [224] T. Yadati, T. Houben, A. Bitorina, i R. Shiri-Sverdlov, „The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management”, *Cells*, t. 9, nr 7, s. E1679, lip. 2020, doi: 10.3390/cells9071679.
- [225] M. Janusz, J. Lisowski, i F. Franěk, „Isolation and characterization of a proline-rich polypeptide from ovine colostrum”, *FEBS Lett*, t. 49, nr 2, s. 276–279, grudz. 1974, doi: 10.1016/0014-5793(74)80529-6.
- [226] J. Leszek, A. D. Inglot, M. Janusz, J. Lisowski, K. Krukowska, i J. A. Georgiades, „Colostrinin: a proline-rich polypeptide (PRP) complex isolated from ovine colostrum for treatment of Alzheimer’s disease. A double-blind, placebo-controlled study”, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, t. 47, nr 6, s. 377–385, 1999.
- [227] M. Janusz i A. Zabłocka, „Colostrin proline-rich polypeptides--immunoregulatory properties and prospects of therapeutic use in Alzheimer’s disease”, *Curr Alzheimer Res*, t. 7, nr 4, s. 323–333, cze. 2010, doi: 10.2174/156720510791162377.
- [228] A. Zabłocka, A. Sosnowska, A. Urbaniak, M. Janusz, i A. Polanowski, „Peptides accompanying chicken egg yolk IgY – alternative methods of isolation and immunoregulatory activity”, *Food Funct.*, t. 5, nr 4, s. 724–733, mar. 2014, doi: 10.1039/C3FO60391A.
- [229] A. Zambrowicz, A. Zabłocka, M. Sudoł, Ł. Bobak, P. Sosicka, i T. Trziszka, „The effect of carbohydrate moieties on immunoregulatory activity of yolkin polypeptides naturally occurring in egg yolk”, *LWT*, t. 88, s. 165–173, luty 2018, doi: 10.1016/j.lwt.2017.09.046.
- [230] W. Kazana, Mitkiewicz, M., Ochnik, M., Sochocka, M., Zambrowicz, A., Piechowiak, G., Macała, J., Miernikiewicz, P., & Zabłocka, A. „Yolkin Isolated from Hen Egg Yolk as a Natural Immunoregulator, Activating Innate Immune Response in BMDM Macrophages”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, t. 2020, s. 1–14, maj 2020, doi: 10.1155/2020/5731021.
- [231] W. Kazana, Jakubczyk, D., Pacyga-Prus, K., Leszczyńska, K., Górska, S., Siednienko, J., Macała, J., Piechowiak, G., & Zabłocka, A. „A Novel Mechanism of Macrophage Activation by the Natural Yolkin Polypeptide Complex from Egg Yolk”, *Int J Mol Sci*, t. 23, nr 6, s. 3125, mar. 2022, doi: 10.3390/ijms23063125.
- [232] B. Obmińska-Mrukowicz, Szczypka, M., Lis, M., Pawlak, A., Suszko-Pawłowska, A., Sysak, A., Zambrowicz, A., Burster, T., Kocięba, M., Artym, J., Zaczyńska, E., Kochanowska, I., & Zimecki, M. „Effects of yolkin on the immune response of mice and its plausible mechanism of action”, *Immunol Lett*, t. 220, s. 21–31, kwi. 2020, doi: 10.1016/j.imlet.2020.01.003.
- [233] A. Zabłocka, Ł. Bobak, J. Macała, J. Rymaszewska, W. Kazana, i A. Zambrowicz, „Comparative Studies of Yolkin Preparations Isolated from Egg Yolks of Selected Bird Species”, 2021, doi: 10.1002/cbdv.202100178.
- [234] M. L. Palumbo, A. D. Moroni, S. Quiroga, M. M. Castro, A. L. Burgueño, i A. M. Genaro, „Immunomodulation induced by central nervous system-related peptides as a therapeutic strategy for neurodegenerative disorders”, *Pharmacology Research & Perspectives*, t. 9, nr 5, s. e00795, 2021, doi: 10.1002/prp2.795.
- [235] D. Parra-Villamar, D., Blancas-Espinoza, L., Garcia-Vences, E., Herrera-García, J., Flores-Romero, A., Toscano-Zapien, A., Villa, J. V., Barrera-Roxana, R., Karla, S. Z., Ibarra, A., & Silva-García, R. „Neuroprotective effect of immunomodulatory peptides in rats with traumatic spinal cord injury”, *Neural Regen Res*, t. 16, nr 7, s. 1273, 2021, doi: 10.4103/1673-5374.301485.
- [236] B. Stańczykiewicz, B. Konopska, J. Gburek, K. Gołąb, i A. Zabłocka, „Immunoregulatory and neuroprotective activity of ovocystatin”, *Journal of the Neurological Sciences*, t. 429, paź. 2021, doi: 10.1016/j.jns.2021.119043.
- [237] M. Jakubik, J. Rymaszewska, A. Polanowski, i T. Trziszka, „Zastosowanie preparatu o właściwościach immunoregulatorowych.”, 217193, 2013

- [238] M. Lemieszewska, Jakubik-Witkowska, M., Stańczykiewicz, B., Zambrowicz, A., Zabłocka, A., Polanowski, A., Trziszka, T., & Rymaszewska, J. „Pro-Cognitive Properties of the Immunomodulatory Polypeptide Complex, Yolkin, from Chicken Egg Yolk and Colostrum-Derived Substances: Analyses Based on Animal Model of Age-Related Cognitive Deficits”, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, t. 64, nr 5, s. 425–434, paź. 2016, doi: 10.1007/s00005-016-0392-z.
- [239] T. L. Nguyen, C. K. Kim, J.-H. Cho, K.-H. Lee, i J.-Y. Ahn, „Neuroprotection signaling pathway of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor against staurosporine induced apoptosis in hippocampal H19-7 cells”, *Exp Mol Med*, t. 42, nr 8, s. 583, 2010, doi: 10.3858/emmm.2010.42.8.060.
- [240] D. Kłopotowska, „Konstrukcja modelu badawczego do identyfikacji genów aktywowanych w komórkach neuralnych przez szlaki sygnałowe zależne od receptora neurotrofimu -3 (TrkC)”, *IITD PAN, Wrocław*, 2007.
- [241] T. Mosmann, „Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays”, *J Immunol Methods*, t. 65, nr 1–2, s. 55–63, grudz. 1983, doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [242] P. Chomczynski i N. Sacchi, „Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction”, *Anal Biochem*, t. 162, nr 1, s. 156–159, kwi. 1987, doi: 10.1006/abio.1987.9999.
- [243] Kobiółka M., Kochanowska I.E., i Gorczyca W.A, „Oznaczenie wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP i cGMP metodą ELISA”, t. 38, nr 2, s. 165–174, 2002.
- [244] H. Wang i J. A. Joseph, „Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader”, *Free Radic Biol Med*, t. 27, nr 5–6, s. 612–616, wrz. 1999, doi: 10.1016/S0891-5849(99)00107-0.
- [245] H. Zhang, Q. Kong, J. Wang, Y. Jiang, i H. Hua, „Complex roles of cAMP–PKA–CREB signaling in cancer”, *Experimental Hematology & Oncology*, t. 9, nr 1, s. 32, lis. 2020, doi: 10.1186/s40164-020-00191-1.
- [246] X. Wang, K. Wang, X. Wu, W. Huang, i L. Yang, „Role of the cAMP–PKA–CREB–BDNF pathway in abnormal behaviours of serotonin transporter knockout mice”, *Behavioural Brain Research*, t. 419, s. 113681, luty 2022, doi: 10.1016/j.bbr.2021.113681.
- [247] J. M. Steichen i in., „Global Consequences of Activation Loop Phosphorylation on Protein Kinase A”, *Journal of Biological Chemistry*, t. 285, nr 6, s. 3825–3832, luty 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.061820.
- [248] K. H. Lee, M. Cha, i B. H. Lee, „Neuroprotective Effect of Antioxidants in the Brain”, *Int J Mol Sci*, t. 21, nr 19, s. E7152, wrz. 2020, doi: 10.3390/ijms21197152.
- [249] OECD, „Demography - Elderly population - OECD Data”, OECD, 2022. <http://data.oecd.org/pop/elderly-population.htm> (dostęp 30 październik 2022).
- [250] B. A. Yankner, T. Lu, i P. Loerch, „The aging brain”, *Annu Rev Pathol*, t. 3, s. 41–66, 2008, doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.2.010506.092044.
- [251] A. Szmyt, A. Zabłocka, J. Macała, J. Chrzanowska, i A. Dąbrowska, „C-Terminal Fragment of Vitellogenin II, a Potential Yolkin Polypeptide Complex Precursor Protein—Heterologous Expression, Purification, and Immunoregulatory Activity”, *Int J Mol Sci*, t. 22, nr 13, s. 7223, lip. 2021, doi: 10.3390/ijms22137223.
- [252] O. Carnevali, R. Carletta, A. Cambi, A. Vita, i N. Bromage, „Yolk Formation and Degradation during Oocyte Maturation in Seabream *Sparus aurata*: Involvement of Two Lysosomal Proteinases<sup>1</sup>”, *Biology of Reproduction*, t. 60, nr 1, s. 140–146, sty. 1999, doi: 10.1095/biolreprod60.1.140.
- [253] W. Zhang i in., „Neuron activity–induced Wnt signaling up-regulates expression of brain-derived neurotrophic factor in the pain neural circuit”, *Journal of Biological Chemistry*, t. 293, nr 40, s. 15641–15651, paź. 2018, doi: 10.1074/jbc.RA118.002840.
- [254] J.-M. Jiang i in., „BDNF-TrkB pathway mediates neuroprotection of hydrogen sulfide against formaldehyde-induced toxicity to PC12 cells”, *PLoS One*, t. 10, nr 3, s. e0119478, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0119478.
- [255] A. Zabłocka, A. Zambrowicz, J. Macała, W. Kazanal, i A. Polanowski, „Yolkin- A Polypeptide Complex Isolated From Chicken Egg Yolk with Potential Neuroprotective and Antioxidative Activity”, *Neuropsychiatry*, t. 08, nr 03, 2018, doi: 10.4172/Neuropsychiatry.1000410.
- [256] A. A. Abd El-Fattah, A. T. Fahim, N. A. H. Sadik, i B. M. Ali, „Resveratrol and dimethyl fumarate ameliorate depression-like behaviour in a rat model of chronic unpredictable mild stress”, *Brain Res*, t. 1701, s. 227–236, grudz. 2018, doi: 10.1016/j.brainres.2018.09.027.
- [257] D. Kim i in., „Effect of the flavonoid, oroxylin A, on transient cerebral hypoperfusion-induced

- memory impairment in mice”, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, t. 85, nr 3, s. 658–668, lis. 2006, doi: 10.1016/j.pbb.2006.10.025.
- [258] K. Sałaciak, A. Koszałka, E. Żmudzka, i K. Pytka, „The Calcium/Calmodulin-Dependent Kinases II and IV as Therapeutic Targets in Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disorders”, *Int J Mol Sci*, t. 22, nr 9, s. 4307, kwi. 2021, doi: 10.3390/ijms22094307.
- [259] T. Iwamoto, N. Mamiya, S. Masushige, i S. Kida, „PLC $\gamma$ 2 Activates CREB-dependent Transcription in PC12 Cells Through Phosphorylation of CREB at Serine 133”, *Cytotechnology*, t. 47, nr 1–3, s. 107–116, sty. 2005, doi: 10.1007/s10616-005-3763-6.
- [260] P. Sassone-Corsi, „The Cyclic AMP Pathway”, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, t. 4, nr 12, s. a011148–a011148, grudz. 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a011148.
- [261] M. Pan i C. Zhang, „Stimulatory effect of gonadal hormones on fetal rat hippocampal neural proliferation requires neurotrophin receptor activation in vitro”, *Neuroscience Letters*, t. 546, s. 1–5, cze. 2013, doi: 10.1016/j.neulet.2013.04.029.
- [262] W. Wu, X. Yu, X.-P. Luo, S.-H. Yang, i D. Zheng, „Tetramethylpyrazine protects against scopolamine-induced memory impairments in rats by reversing the cAMP/PKA/CREB pathway”, *Behav Brain Res*, t. 253, s. 212–216, wrz. 2013, doi: 10.1016/j.bbr.2013.07.052.
- [263] Y. Zhong i in., „PKA-CREB-BDNF signaling pathway mediates propofol-induced long-term learning and memory impairment in hippocampus of rats”, *Brain Research*, t. 1691, s. 64–74, lip. 2018, doi: 10.1016/j.brainres.2018.04.022.
- [264] Y. Luo, S. Kuang, H. Li, D. Ran, i J. Yang, „cAMP/PKA-CREB-BDNF signaling pathway in hippocampus mediates cyclooxygenase 2-induced learning/memory deficits of rats subjected to chronic unpredictable mild stress”, *Oncotarget*, t. 8, nr 22, s. 35558–35572, mar. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.16009.
- [265] J. Ruan, L. Liu, X. Shan, B. Xia, i Q. Fu, „Anti-depressant effects of oil from fructus gardeniae via PKA-CREB-BDNF signaling”, *Biosci Rep*, t. 39, nr 4, s. BSR20190141, kwi. 2019, doi: 10.1042/BSR20190141.
- [266] J.-L. Zhen, Y.-N. Chang, Z.-Z. Qu, T. Fu, J.-Q. Liu, i W.-P. Wang, „Luteolin rescues pentylentetrazole-induced cognitive impairment in epileptic rats by reducing oxidative stress and activating PKA/CREB/BDNF signaling”, *Epilepsy Behav*, t. 57, nr Pt A, s. 177–184, kwi. 2016, doi: 10.1016/j.yebeh.2016.02.001.
- [267] C.-L. Ma i in., „Neuroprotective effect of gastrodin in methamphetamine-induced apoptosis through regulating cAMP/PKA/CREB pathway in cortical neuron”, *Hum Exp Toxicol*, t. 39, nr 8, s. 1118–1129, sie. 2020, doi: 10.1177/0960327120911438.
- [268] Y. Li i Z. Zhang, „Gastrodin improves cognitive dysfunction and decreases oxidative stress in vascular dementia rats induced by chronic ischemia”, *Int J Clin Exp Pathol*, t. 8, nr 11, s. 14099–14109, lis. 2015.
- [269] S.-H. Ahn i in., „Rhynchosia volubilis Promotes Cell Survival via cAMP-PKA/ERK-CREB Pathway”, *Pharmaceuticals (Basel)*, t. 15, nr 1, s. 73, sty. 2022, doi: 10.3390/ph15010073.
- [270] H.-C. Lai i in., „Neurotrophic Effect of Citrus 5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'-Hexamethoxyflavone: Promotion of Neurite Outgrowth via cAMP/PKA/CREB Pathway in PC12 Cells”, *PLoS ONE*, t. 6, nr 11, s. e28280, lis. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0028280.
- [271] W.-P. Li i in., „Molecular mechanism of panaxydol on promoting axonal growth in PC12 cells”, *Neural Regen Res*, t. 13, nr 11, s. 1927–1936, lis. 2018, doi: 10.4103/1673-5374.239439.
- [272] L.-F. Lin, S.-P. Chiu, M.-J. Wu, P.-Y. Chen, i J.-H. Yen, „Luteolin Induces microRNA-132 Expression and Modulates Neurite Outgrowth in PC12 Cells”, *PLoS ONE*, t. 7, nr 8, s. e43304, sie. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0043304.
- [273] Q. Cui, X. Li, i H. Zhu, „Curcumin ameliorates dopaminergic neuronal oxidative damage via activation of the Akt/Nrf2 pathway”, *Molecular Medicine Reports*, t. 13, nr 2, s. 1381–1388, luty 2016, doi: 10.3892/mmr.2015.4657.
- [274] M. Hu, F. Li, i W. Wang, „Vitexin protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease through PI3K/Akt signaling pathway”, *DDDT*, t. 12, s. 565–573, mar. 2018, doi: 10.2147/DDDT.S156920.
- [275] X. Liu i in., „Ginsenoside Rd promotes neurogenesis in rat brain after transient focal cerebral ischemia via activation of PI3K/Akt pathway”, *Acta Pharmacol Sin*, t. 36, nr 4, s. 421–428, kwi. 2015, doi: 10.1038/aps.2014.156.
- [276] X. Ren, J. Zhang, Y. Zhao, i L. Sun, „Senegenin Inhibits A $\beta$ 1-42-Induced PC12 Cells Apoptosis and Oxidative Stress via Activation of the PI3K/Akt Signaling Pathway”, *Neuropsychiatr Dis Treat*, t. 18, s. 513–

- 524, mar. 2022, doi: 10.2147/NDT.S346238.
- [277] N. Lu i C. J. Malemud, „Extracellular Signal-Regulated Kinase: A Regulator of Cell Growth, Inflammation, Chondrocyte and Bone Cell Receptor-Mediated Gene Expression”, *Int J Mol Sci*, t. 20, nr 15, s. E3792, sie. 2019, doi: 10.3390/ijms20153792.
- [278] Y. Matsuoka i J. Yang, „Selective inhibition of ERK1/2 blocks NGF to BDNF signaling and suppresses the development of and reverses already established pain behavior in rats”, *Neuroscience*, t. 206, s. 224–236, mar. 2012, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.01.002.
- [279] C. Su, W. Underwood, N. Rybalchenko, i M. Singh, „ERK1/2 and ERK5 have distinct roles in the regulation of brain-derived neurotrophic factor expression”, *J. Neurosci. Res.*, t. 89, nr 10, s. 1542–1550, paź. 2011, doi: 10.1002/jnr.22683.
- [280] W. Kazana, D. Jakubczyk, J. Siednienko, A. Zambrowicz, J. Macała, i A. Zabłocka, „Mechanism of Molecular Activity of Yolkin-a Polypeptide Complex Derived from Hen Egg Yolk-in PC12 Cells and Immortalized Hippocampal Precursor Cells H19-7”, *Mol Neurobiol*, luty 2023, doi: 10.1007/s12035-023-03246-6.
- [281] V. K. Sharma i in., „Novel interaction between neurotrophic factor- $\alpha$ 1/carboxypeptidase E and serotonin receptor, 5-HTR1E, protects human neurons against oxidative/neuroexcitotoxic stress via  $\beta$ -arrestin/ERK signaling”, *Cell Mol Life Sci*, t. 79, nr 1, s. 24, 2022, doi: 10.1007/s00018-021-04021-3.
- [282] X. Liu, X. Wang, i J. Lu, „Tenuifoliside A promotes neurite outgrowth in PC12 cells via the PI3K/AKT and MEK/ERK/CREB signaling pathways”, *Molecular Medicine Reports*, t. 12, nr 5, s. 7637–7642, lis. 2015, doi: 10.3892/mmr.2015.4397.
- [283] Y. Ma i in., „Claulansine F promotes neuritogenesis in PC12 cells via the ERK signaling pathway”, *Acta Pharmacol Sin*, t. 34, nr 12, s. 1499–1507, grudz. 2013, doi: 10.1038/aps.2013.95.
- [284] B. Wiatrak, A. Kubis-Kubiak, A. Piwowar, i E. Barg, „PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions”, *Cells*, t. 9, nr 4, s. 958, kwi. 2020, doi: 10.3390/cells9040958.
- [285] Y. Banno i in., „Depolarization-induced differentiation of PC12 cells is mediated by phospholipase D2 through the transcription factor CREB pathway”, *Journal of Neurochemistry*, t. 104, nr 5, s. 1372–1386, 2008, doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05085.x.
- [286] N. Akchiche i in., „Differentiation and neural integration of hippocampal neuronal progenitors: Signaling pathways sequentially involved”, *Hippocampus*, t. 20, nr 8, s. 949–961, 2010, doi: 10.1002/hipo.20690.
- [287] Y. Ogra i in., „Changes in intracellular copper concentration and copper-regulating gene expression after PC12 differentiation into neurons”, *Sci Rep*, t. 6, nr 1, Art. nr 1, wrz. 2016, doi: 10.1038/srep33007.
- [288] B. Zhou, Q. Cai, Y. Xie, i Z.-H. Sheng, „Snapin Recruits Dynein to BDNF-TrkB Signaling Endosomes for Retrograde Axonal Transport and Is Essential for Dendrite Growth of Cortical Neurons”, *Cell Reports*, t. 2, nr 1, s. 42–51, lip. 2012, doi: 10.1016/j.celrep.2012.06.010.
- [289] L. Hromadkova i in., „Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes molecular polarization and differentiation of immature neuroblastoma cells into definitive neurons”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, t. 1867, nr 9, s. 118737, wrz. 2020, doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118737.
- [290] M. H. Kang i in., „Sasa borealis Ethanol Extract Protects PC12 Neuronal Cells against Oxidative Stress”, *Applied Sciences*, t. 12, nr 12, s. 6155, cze. 2022, doi: 10.3390/app12126155.
- [291] A. Kicel i M. A. Olszewska, „Evaluation of Antioxidant Activity, and Quantitative Estimation of Flavonoids, Saponins and Phenols in Crude Extract and Dry Fractions of *Medicago lupulina* Aerial Parts”, *Natural Product Communications*, t. 10, nr 3, s. 1934578X1501000326, mar. 2015, doi: 10.1177/1934578X1501000326.
- [292] L.-S. Lee, S.-H. Kim, Y.-B. Kim, i Y.-C. Kim, „Quantitative Analysis of Major Constituents in Green Tea with Different Plucking Periods and Their Antioxidant Activity”, *Molecules (Basel, Switzerland)*, t. 19, s. 9173–86, lip. 2014, doi: 10.3390/molecules19079173.
- [293] H. Liao, W. Dong, X. Shi, H. Liu, i K. Yuan, „Analysis and comparison of the active components and antioxidant activities of extracts from *Abelmoschus esculentus* L”, *Pharmacogn Mag*, t. 8, nr 30, s. 156–161, kwi. 2012, doi: 10.4103/0973-1296.96570.
- [294] M. A. Olszewska, „In vitro antioxidant activity and total phenolic content of the inflorescences, leaves and fruits of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz”, *Acta Pol Pharm*, t. 68, nr 6, s. 945–953, 2011.
- [295] J. P. Adjimani i P. Asare, „Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators”, *Toxicology Reports*, t. 2, s. 721–728, sty. 2015, doi: 10.1016/j.toxrep.2015.04.005.
- [296] M. Lemieszewska, J. Rymaszewska, S. Bartłomiej, i Z. Agnieszka, „The effects of NP-POL, the

- nonapeptide constituent of Colostrinin, on intra”, *Postepy Hig Med Dosw*, t. 74, s. 471–480, 2020.
- [297] M. Lemieszewska i in., „Isolation and Characterization of NP-POL Nonapeptide for Possible Therapeutic Use in Parkinson’s Disease”, *Oxid Med Cell Longev*, t. 2018, s. 3760124, lip. 2018, doi: 10.1155/2018/3760124.
- [298] A. Boubakri i in., „Allium roseum L. extract inhibits amyloid beta aggregation and toxicity involved in Alzheimer’s disease”, *PLoS One*, t. 15, nr 9, s. e0223815, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0223815.
- [299] R. Jesky i H. Chen, „The neuritogenic and neuroprotective potential of senegenin against A $\beta$ -induced neurotoxicity in PC 12 cells”, *BMC Complement Altern Med*, t. 16, s. 26, sty. 2016, doi: 10.1186/s12906-016-1006-3.
- [300] Q. Nie, X. Du, i M. Geng, „Small molecule inhibitors of amyloid  $\beta$  peptide aggregation as a potential therapeutic strategy for Alzheimer’s disease”, *Acta Pharmacol Sin*, t. 32, nr 5, s. 545–551, maj 2011, doi: 10.1038/aps.2011.14.
- [301] K. Pagano, S. Tomaselli, H. Molinari, i L. Ragona, „Natural Compounds as Inhibitors of A $\beta$  Peptide Aggregation: Chemical Requirements and Molecular Mechanisms”, *Frontiers in Neuroscience*, t. 14, 2020, Dostęp: 14 luty 2023. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2020.619667>

## 11. Dorobek naukowy

### Wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie zostały częściowo opublikowane w pracy:

- 1) **Kazana, W.**, Jakubczyk, D., Siednienko, J., Zambrowicz, A., Macała, J., & Zabłocka, A. (2023). Mechanism of Molecular Activity of Yolkin-a Polypeptide Complex Derived from Hen Egg Yolk-in PC12 Cells and Immortalized Hippocampal Precursor Cells H19-7. *Molecular neurobiology*, 10.1007/s12035-023-03246-6. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03246-6>
- 2) Zabłocka A, Zambrowicz A, Macała J., **Kazana W.**, Polanowski A. (2018). Yolkin- A Polypeptide Complex Isolated From Chicken Egg Yolk with Potential Neuroprotective and Antioxidative Activity, *Neuropsychiatry (London)* 2018 8(3), 833-842, DOI: 10.4172/Neuropsychiatry.1000410

### Część wstępu teoretycznego zawarto również w pracy:

- 1) **Kazana W.**, Zabłocka A. (2020). Czynniki neurotroficzne pochodzenia mózgowego jako potencjalne narzędzie terapeutyczne w leczeniu schorzeń układu nerwowego. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 74, 517–531. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0014.5678>

### Pozostałe publikacje:

- 1) Mucha, S. G., Piksa, M., Firlej, L., Krystyniak, A., Różycka, M. O., **Kazana, W.**, Pawlik, K. J., Samoć, M., & Matczyszyn, K. (2022). Non-toxic Polymeric Dots with the Strong Protein-Driven Enhancement of One- and Two-Photon Excited Emission for Sensitive and Non-destructive Albumin Sensing. *ACS applied materials & interfaces*, 14(35), 40200–40213. <https://doi.org/10.1021/acsmi.2c08858>
- 2) **Kazana, W.**, Jakubczyk, D., Pacyga-Prus, K., Leszczyńska, K., Górska, S., Siednienko, J., Macała, J., Piechowiak, G., & Zabłocka, A. (2022). A Novel Mechanism of Macrophage Activation by the Natural Yolkin Polypeptide Complex from Egg Yolk. *International journal of molecular sciences*, 23(6), 3125. <https://doi.org/10.3390/ijms23063125>
- 3) Zabłocka, A., **Kazana, W.**, Sochocka, M., Stańczykiewicz, B., Janusz, M., Leszek, J., & Orzechowska, B. (2021). Inverse Correlation Between Alzheimer's Disease and Cancer: Short Overview. *Molecular neurobiology*, 58(12), 6335–6349. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02544-1>
- 4) Zabłocka, A., Bobak, Ł., Macała, J., Rymaszewska, J., **Kazana, W.**, & Zambrowicz, A. (2021). Comparative Studies of Yolkin Preparations Isolated from Egg Yolks of Selected Bird Species. *Chemistry & biodiversity*, 18(7), e2100178. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100178>
- 5) **Kazana, W.**, Mitkiewicz, M., Ochnik, M., Sochocka, M., Zambrowicz, A., Piechowiak, G., Macała, J., Miernikiewicz, P., & Zabłocka, A. (2020). Yolkin Isolated from Hen Egg Yolk as a Natural Immunoregulator, Activating Innate Immune Response in BMDM Macrophages. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 5731021. <https://doi.org/10.1155/2020/5731021>
- 6) Greb-Markiewicz, B., **Kazana, W.**, Zarębski, M., & Ożyhar, A. (2019). The subcellular localization of bHLH transcription factor TCF4 is mediated by multiple nuclear localization and nuclear export signals. *Scientific reports*, 9(1), 15629. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52239-w>

### **Zgłoszenia konferencyjne związane z tematyką rozprawy doktorskiej:**

- 1) **Kazana W.**, Zambrowicz A., Macała J., Zabłocka A. XV Międzynarodowe Sympozjum „Molekularne podstawy patologii i terapii w zaburzeniach neurologicznych”, 20-22.10.2022, Warszawa. *Yolkin – a polypeptide complex isolated from chicken egg yolk upregulates expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in PC12 and H19-7 cells* (plakat)
- 2) **Kazana W.**, Zambrowicz A., Zabłocka A. 5 Międzynarodowa Konferencja Cell Biology, 10-12.05.2019, Kraków. *BDNF secretion regulated by yolkin, polypeptide complex isolated from hen egg yolk, is connected with synapsin 1 and carboxypeptidase E upregulation.* (plakat)  
*Secretion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a part of neuroprotective activity of yolkin polypeptide complex isolated from hen egg yolk* (prezentacja ustna)
- 3) **Kazana W.**, Polanowski A., Zambrowicz A., Siednienko J., Zabłocka A. 12 Międzynarodowa Konferencja Alzheimer's Disease & Dementia, 29-31.10.2018, Walencja, Hiszpania. *Yolkin polypeptide complex isolated from hen egg yolk regulates BDNF production in PC12 cells via cAMP/CREB-dependent mechanism* (plakat)  
*Yolkin polypeptide complex from hen egg yolk-isolation, characterization and neuroprotective activity* (prezentacja ustna)
- 4) **Kazana W.**, Zambrowicz A., Macała J., Polanowski A., Zabłocka A. Międzynarodowa Konferencja Biotechnology: Research and Industrial Applications Conference, 19.06.2018, Wrocław. *Yolkin – a polypeptide complex isolated from hen egg yolk and its potential neuroprotective effect* (prezentacja ustna)
- 5) **Kazana W.**, Zambrowicz A., Macała J., Polanowski A., Zabłocka A. Międzynarodowa Konferencja Neuronus 2018 Ibro Neuroscience Forum, 20-22.04.2018, Kraków. *Polypeptide complex yolkin from chicken egg yolk as a potential modulator of BDNF expression/secretion – a pilot study* (plakat)

### **Nagrody i wyróżnienia**

- 1) Wyróżnienie w konkursie na Stypendium im. Ludwika Hirszfelda w zakresie nauk biologicznych i medycznych w roku 2021
- 2) Laureatka Stypendium Doktoranckiego Polsko-Amerykańskiej Fundacji Wolności w roku 2020/2021
- 3) Laureatka Stypendium Rektora Instytutu PAN dla najlepszych doktorantów w roku 2018/2019 oraz 2019/2020
- 4) Pierwsza nagroda za publikację i prezentację w sesji „Between atoms and molecules” podczas 15. Międzynarodowej Konferencji naukowej Students' Science Conference w Jeleniej Górze (2017)

### **Pozostałe**

- 1) Wykonawca w projekcie badawczym finansowanym przez NCBiR, pt.: ”Badania nad uzyskaniem nowatorskiej szczepionki przeciwko wirusowi SARS-CoV-2 odpowiedzialnemu za chorobę COVID-19”, (XII. 2020-III.2022, kierownik projektu: prof. dr hab. Andrzej Gamian)
- 2) Staż w Laboratorium Neurobiologii Eksperymentalnej w Narodowym Instytucie Zdrowia Psychicznego w Klecanach, Czechy (07.2019 – 10.2019)