

mgr Olga Krupska

Efekty biologiczne translokacji kinazy białkowej C β II do mitochondriów
po epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym mózgu myszokoczka

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w dyscyplinie: biologii medycznej

Promotor: Prof. dr hab. Barbara Zabłocka
Promotor pomocniczy: Dr Małgorzata Beręsewicz



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2018

Wykonanie niniejszej pracy było możliwe dzięki wsparciu finansowemu udzielonemu przez:

- **Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego** w ramach projektu interdyscyplinarnych studiów doktoranckich KNOW **“The search for new biomarkers of civilization diseases using high-throughput techniques and modern diagnostic imaging”** (decyzja MNiSW-DS.-6002-4693-30/WA/12) realizowanego w latach 2013-2017 w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN (IMDiK PAN);
- **Narodowe Centrum Nauki** - granty nr 2012/05/B/NZ3/00415 i 2014/15/D/NZ3/02784;
- **Komisję Europejską** w ramach programu Erasmus+ umożliwiającego odbycie praktyk studenckich przez autorkę rozprawy w Centrum Metabolomiki i Bioanaliz (Centre for Metabolomics and Bioanalysis, CEMBIO) mieszczącym się na Uniwersytecie San Pablo CEU w Madrycie;

Wyniki przedstawione w pracy zostały częściowo opublikowane w:

Krupska, O., Sarnowska, A., Fedorczyk, B., Gewartowska, M., Misicka, A., Zablocka, B., Beresewicz, M. (2017). Ischemia/reperfusion-induced translocation of PKC β II to mitochondria as an important mediator of a protective signaling mechanism in an ischemia-resistant region of the hippocampus. *Neurochemical Research*, 42(8), s. 2392-2403. IF= 2,772

Realizacja założeń poniższej pracy była możliwa dzięki współpracy z:

- Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych (LLTM) IMDiK PAN,
- Środowiskowym Laboratorium Mikroskopii Elektronowej IMDiK PAN,
- Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN,
- Wydziałem Chemii Uniwersytetu Warszawskiego i Zakładem Neuropeptydów IMDiK PAN,
- Centrum Metabolomiki i Bioanaliz (Centre for Metabolomics and Bioanalysis, CEMBIO) Uniwersytetu San Pablo CEU w Madrycie.

 Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

KNOW

Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiodący
2012-2017



NARODOWE
CENTRUM
NAUKI



Erasmus+

W pierwszej kolejności pragnę serdecznie podziękować pani prof. dr hab. Barbarze Zablockiej za przyjęcie mnie do swojego zespołu i możliwość realizacji badań w Pracowni Biologii Molekularnej. Dziękuję za wspólne naukowe dyskusje, wsparcie merytoryczne oraz za zaufanie i wiarę w moje możliwości.

Szczególnie dziękuję Małgosi Beręsewicz zarówno za czas poświęcony mi w laboratorium, jak i za nasze niezliczone rozmowy (nie tylko naukowe). Dziękuję za motywację do dalszych działań, naukowe inspiracje, wyrozumiałość, cierpliwość i uśmiech.

Dziękuję Marysi Kawalec i Ani Boratyńskiej-Jasińskiej za miłą atmosferę pracy i cenne wskazówki dotyczące przeprowadzania doświadczeń.

Dziękuję pani doktor Annie Sarnowskiej za niezastąpioną pomoc podczas operacji.

Dziękuję Ewie Sitkiewicz za owocną współpracę przy badaniach proteomicznych.

Many thanks to prof. Daria Mochly-Rosen for a little gesture, which shed new light on my PhD project.

Many thanks to prof. Coral Barbas for an opportunity to conduct the metabolomic analysis in the Centre for Metabolomics and Bioanalysis.

Dziękuję panu prof. dr hab. Krzysztofowi Zablockiemu za uchylenie rąbka tajemnicy o biochemii mitochondriów w hipokampie.

Dziękuję Danusi Dudzik za pokazanie, że metabolomika tylko brzmi strasznie oraz za każdą wypitą „café con leche con miel” podczas realizacji wspólnego projektu.

Many thanks to Tea Kečkeš for teaching me sample treatment for GC-MS, for wonderful Croatian dinners and time spent together.

Dziękuję Dominice Masternak za wszystkie ciepłe słowa i za wszystkie publikacje „niemożliwe do odnalezienia”.

Dziękuję przyjaciółom za to, że nie znudziło im się pytać „Jak tam doktorat?”, ani słuchać o kolejnej „ostatniej wersji”. W szczególności chcę podziękować Gosi Dylewskiej, Karoli Zajdel, Joannie i Damianowi Strzemeckim, Asi i Przemkowi Wiakom, Gosi Proboszcz, Asi Wójtowicz, Kasi Pawlak i Michałowi Kamińskiemu.

Dziękuję mojej rodzinie za ciągle wsparcie i wiarę we mnie. Serdecznie dziękuję mojej siostrze Milce za niekończące się rozmowy i motywację.

Największe podziękowania składam Mojemu Adamowi za wspólną podróż po naukowym świecie, za dzielenie radości z osiągnięć i wielką wyrozumiałość.

Poniższą pracę pragnę dedykować Mojej Babci, która
przez wszystkie lata mojej nauki była zawsze obok.

Spis treści

1.	Alfabetyczny spis skrótów	8
2.	Streszczenie	9
3.	Abstract.....	12
4.	Innowacyjność rozprawy	15
5.	Wstęp	16
5.1	Rodzaje niedokrwienia mózgu	16
5.2	Leczenie w ischemii mózgu	17
5.3	Wybiórcza wrażliwość na sygnał ischemiczno-reperfuzyjny na przykładzie hipokampa..	19
5.4	Poischemiczne zmiany biochemiczne współwystępujące z uszkodzeniem komórek.....	22
5.5	Endogenna neuroprotekcja	24
5.6	PKC β jako jedno z białek sygnałowych aktywowanych po I/R.....	26
6.	Hipoteza badawcza i cele pracy.....	31
7.	Materiały i metody	32
7.1	Odczynniki i roztwory.....	32
7.2	Modele badawcze	33
7.2.1	Model całkowitego niedokrwienia mózgu myszokoczka mongolskiego.....	34
7.2.2	Model ekscytotoksyczności w skrawkach organotypowych hipokampa szczura	36
7.3	Fracjonowanie tkanki.....	36
7.4	Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) i elektrotransfer.....	37
7.5	Western blot.....	38
7.6	Peptyd β IIV5-3 jako narzędzie badawcze – badanie translokacji PKC β II do mitochondriów.....	39
7.6.1	Transmisyjna mikroskopia elektronowa	40
7.6.2	Badanie zmian immunoreaktywności PKC β II we frakcjach S2 i P2 oraz oczyszczonych mitochondriach.....	40
7.7	Test dostępności białek dla proteiny K.....	40
7.8	Detekcja sekwencji kierującej do mitochondriów - MitoFates.....	41
7.9	Test <i>in vitro</i> aktywności enzymatycznej PKC β II w mitochondriach.....	41
7.10	Badanie wpływu inhibitorów PKC β II na śmiertelność komórek.....	42
7.10.1	Doświadczenie z użyciem inhibitorów PKC β II w skrawkach organotypowych hipokampa szczura poddanych ekscytotoksyczności.....	42

7.10.2 Wizualizacja skutków podania inhibitora PKC β II po ischemii i reperfuzji mózgu myszokoczka.....	43
7.11 Chromatografia typu pull-down.....	44
7.12 Badania proteomiczne	44
7.13 Koimmunoprecypitacja	45
7.14 Pomiary aktywności i ilości enzymów	46
7.14.1 Dehydrogenaza pirogronianowa	46
7.14.2 Mitochondrialna ATP-aza (syntaza ATP).....	46
7.15 Badania metabolomiczne	47
7.15.1 Przygotowanie prób.....	48
7.15.2 Rozdział i detekcja metabolitów	49
7.15.3 Analiza danych metabolomicznych	50
7.16 Analiza statystyczna	51
8. Wyniki	52
8.1 Immunoreaktywność PKC β i jej izoform w mitochondriach	52
8.2 Badanie translokacji PKC β II do mitochondriów po krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu	53
8.2.1 Obrazowanie zmian lokalizacji PKC β II po epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej.....	53
8.2.2 Wpływ inhibitora β IIV5-3 na translokację PKC β II do frakcji błonowej wzbogaconej w mitochondria	55
8.2.3 Wpływ inhibitora β IIV5-3 na immunoreaktywność PKC β II we frakcji mitochondrialnej.....	56
8.3 Wewnątrzmitochondrialna lokalizacja PKC β II po epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym	56
8.4 Prawdopodobieństwo występowania sekwencji kierującej do mitochondriów w łańcuchu peptydowym PKC β II.....	57
8.5 Aktywność enzymatyczna PKC β II we frakcji mitochondrialnej	58
8.6 Biologiczne skutki zahamowania aktywności enzymatycznej PKC β II	59
8.6.1 Badanie z użyciem modelu ekscytotoksyczności w skrawkach hipokampa szczura	60
8.6.2 Badanie z użyciem modelu całkowitego niedokrwienia mózgu myszokoczka mongolskiego	62
8.7 Badanie mechanizmu endogennej neuroprotekcji, którego elementem jest PKC β II	64
8.7.1 Wytypowanie potencjalnych mitochondrialnych partnerów PKC β II	65

8.7.2	Weryfikacja oddziaływań PKC β II z potencjalnymi białkowymi partnerami mitochondrialnymi	66
8.7.3	Wpływ PKC β II na aktywność wybranych białek mitochondrialnych	67
8.8	Opis mitochondrialnego metabolomu	70
9.	Dyskusja.....	79
9.1	PKC β II a mitochondria	79
9.2	PKC β II a neuroprotekcja.....	82
9.3	Mechanizm działania PKC β II.....	84
9.3.1	Dehydrogenaza pirogronianowa	85
9.3.2	Mitochondrialna ATP-aza (syntaza ATP).....	86
9.3.3	Karboksylaza pirogronianowa	87
9.3.4	Glutaminaza typu nerkowego.....	88
9.3.5	Wahadła mitochondrialne.....	88
9.3.6	Kompleks I łańcucha transportu elektronów	89
9.3.7	Kompleks III łańcucha transportu elektronów	90
9.4	Metabolomiczne „odciski palca” mitochondriów hipokampa	91
10.	Podsumowanie i wnioski.....	96
11.	Bibliografia	98
11.1	E-źródła.....	114
11.2	Spis rycin.....	114
11.3	Spis tabel.....	115

1. Alfabetyczny spis skrótów

1° (2°)	pierwszorzędowe (drugorzędowe) przeciwciało
257879-35-9	numer identyfikacji chemicznej inhibitora PKC β II opracowanego przez Tanakę i wsp. (2004)
4VO	ang. <i>four-vessel occlusion</i> , model doświadczalny niedokrwienia mózgu polegający na zamknięciu tętnic szyjnych wewnętrznych i kręgowych
BCCA	ang. <i>bilateral clamping of carotid arteries</i> , model doświadczalny niedokrwienia mózgu polegający na obustronnym zamknięciu tętnic szyjnych
BSA	surowicza albumina bydłęca
CA1	łac. <i>cornu Ammoni</i> (pol. róg Amona); region hipokampa obejmujący obszar 1, wrażliwy na niedokrwienie
CA2-4, DG	łac. <i>cornu Ammoni; gyrus dentatus</i> (pol. zakręt zębaty, DG); region hipokampa obejmujący obszary 2-4 i zakręt zębaty, mało wrażliwy na niedokrwienie
COXIV	oksydaza cytochromowa
DMSO	dimetylosulfotlenek
FI	intensywności fluorescencji
GAPDH	dehydrogenaza glicero-3-fosforanowa
GC-MS	chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
GPD2	dehydrogenaza glicero-3-fosforanowa (mitochondrialna)
HS-CoA	koenzym A bez grupy acetylowej
I/R	epizod ischemiczno-reperfuzyjny
I/R 1h (96h)	grupa badana zwierząt poddanych 5-minutowemu niedokrwieniu mózgu i godzinnej reperfuzji (lub 96-godzinnej)
IC ₅₀	stężenie inhibitora hamujące w 50% aktywność enzymu
IP	immunoprecypitat
IP ₃ R	receptor trifosfoinozytolowy
LC-MS/MS	tandemowa spektrometria mas sprzężona z wysokosprawną chromatografią cieczową
LDH	dehydrogenaza mleczanowa
MCAO	ang. <i>middle cerebral artery occlusion</i> , model niedokrwienia mózgu polegający na zamknięciu tętnicy środkowej mózgu
mOD	miliOD, ang. <i>optic density</i> , gęstość optyczna
MPTP	mitochondrialny megakanal
MS	spektrometria mas
MT	frakcja mitochondrialna
NaF	fluorek sodu
NMDA	kwask N-metylo-D-asparaginowy
o/n	całonocna inkubacja
OGD	model kontrolowanego ograniczenia dostępu tlenu i glukozy
OMI	mitochondrialna proteaza serynowa
P2	frakcja błonowa
PC	karboksylaza pirogronianowa
PDH	dehydrogenaza pirogronianowa
PI	prekondycjonowanie ischemiczne
PKC	kinaza białkowa C
RACK	receptor dla aktywnych kinaz białkowych C
RT	temperatura pokojowa
rt-PA	rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu
S2	frakcja cytosolowa
Slc25a11	białkowy przekaźnik jabłczan/2-oksoglutaran
TBST	sól fizjologiczna buforowana TRIS o pH 7,4 wzbogacona o Tween20
TIM23	translokaza błony wewnętrznej mitochondriów 23
TOM20	translokaza zewnętrznej błony mitochondrialnej 20
TUNEL	technika znakowania fragmentów DNA za pomocą dUTP przy udziale terminalnej transferazy
VDAC	kanal anionowy zależny od napięcia
β IIV5-3	peptydowy inhibitor PKC β II

2. Streszczenie

Poniższa rozprawa doktorska dotyczy badań patologii niedokrwiennej mózgu, a w szczególności molekularnych mechanizmów rozprzestrzeniania się sygnału ischemiczno-reperfuzyjnego (I/R) w komórce. Uważa się, że stan metaboliczny mitochondriów jest istotny w poischemicznych procesach prowadzących zarówno do śmierci, jak i też do ochrony komórek (Sims i Muyderman 2010, Jackson i wsp. 2018). Fakt ten powoduje, że wspomniane organella mogą być celem terapii neuroprotekcijnej. Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują na możliwy udział kinaz białkowych C (PKC) w regulacji funkcjonowania mitochondriów, co może wpływać na los komórek po epizodzie I/R. Kinazy białkowe C stanowią rodzinę enzymów fosforylujących reszty serynowe i treoninowe białek. Reakcja ta umożliwia kinazom regulację działania białek, co w efekcie może wpływać na funkcjonowanie komórki, np. na jej wzrost, czy regulację transkrypcji (Nishizuka 1986, 1992, 1995, Asaoka i wsp. 1992, Dekker i Parker 1994). Aktywacja większości izoform PKC związana jest z przeniesieniem cząsteczek enzymu z cytoplazmy do błon komórkowych. Wiadomo, że rodzaj zewnątrzkomórkowego sygnału i wewnątrzkomórkowego aktywatora może mieć wpływ na selektywną translokację poszczególnych PKC do odmiennych przedziałów komórkowych (Shirai i wsp. 1998). Jednym z sygnałów aktywujących PKC jest stres ischemiczno-reperfuzyjny, który powoduje translokację tych enzymów m. in. do mitochondriów (Kowalczyk i wsp. 2009 i 2012, Budas i wsp. 2010, Zheng i wsp. 2011, Sun i wsp. 2013). Badania poischemicznego przemieszczania się PKC do mitochondriów wskazują na: rolę PKC δ w procesie apoptozy, funkcję PKC ϵ w hartowaniu ischemicznym serca (Churchill i Mochly-Rosen 2007, Budas i wsp. 2010), czy potencjalny udział PKC α i β w regulacji metabolizmu mitochondriów (Nowak i Bakajsova 2012, 2015, Kowalczyk i wsp. 2012).

Z wcześniejszych badań prowadzonych w naszej Pracowni wynika, że na skutek krótkotrwałego epizodu ischemiczno-reperfuzyjnego mózgu myszokoczka, immunoreaktywność PKC β zwiększa się w mitochondriach izolowanych z mało wrażliwego na ischemię regionu hipokampa - CA2-4, DG. Dodatkowo, hamowanie aktywności PKC β powoduje zwiększenie ekscytotoksycznego uszkodzenia w skrawkach organotypowych hipokampa szczura (Kowalczyk i wsp. 2012). Wyniki te, sugerują potencjalną neuroprotekcijną rolę PKC β co zgodne jest z badaniami innych grup, wykazującymi ochronne działanie tej kinazy w modelach prekondukcjonowania hipoksyjnego mózgu myszy (Niu i wsp. 2005, Bu i wsp. 2011).

Celem badań było zweryfikowanie hipotezy o udziale PKC β w endogennej neuroprotekcji po krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu oraz poznanie mechanizmu działania tej kinazy w mitochondriach.

Do weryfikacji hipotezy o potencjalnej roli PKC β w procesach umożliwiających przeżycie komórek zastosowano dwa uznane modele doświadczalne, powszechnie używane w badaniach niedokrwienia mózgu: *in vivo* - obustronne, 5-minutowe zaciśnięcie tętnic szyjnych wspólnych myszokoczek mongolskiego i *in vitro* - wywołanie stresu ekscytotoksycznego w hodowli organotypowej skrawków hipokampa szczura. W obu modelach doświadczalnych po zastosowaniu odpowiedniego bodźca stresowego (I/R lub ekscytotoksyczność) dochodzi do wybiórczego uszkodzenia neuronów w regionie CA1 hipokampa, przy jednoczesnym zachowaniu struktury w regionie CA2-4, DG.

W badaniach wykazano, że z dwóch izoform PKC β to PKC β II jest tą, której immunoreaktywność rośnie po krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu myszokoczek we frakcji mitochondrialnej otrzymanej z regionu hipokampa mało wrażliwego na epizod ischemiczno-reperfuzyjny (I/R) – CA2-4, DG. Udowodniono, że obserwowany poischemiczny wzrost immunoreaktywności PKC β II w mitochondriach wynika z przemieszczania się tej kinazy z cytosolu do mitochondriów. Wykazano, że PKC β II po I/R może znajdować się w macierzy mitochondrialnej. Dodatkowo zweryfikowano, że w sekwencji aminokwasowej PKC β II nie ma klasycznej sekwencji kierującej białka do mitochondriów. Oznacza to, że translokacja PKC β II do wspomnianych organelli odbywa się w sposób inny niż klasyczny. W kolejnych doświadczeniach zastosowano peptydowy inhibitor PKC β II (β IIV5-3), który pogłębił uszkodzenie komórek nerwowych wywołane przez stres ekscytotoksyczny w modelu *in vitro* i I/R w modelu *in vivo*. Powyższe wyniki sugerują neuroprotektoryjną funkcję PKC β II, której szczegóły badano w kolejnym etapie projektu. Dowiedziono, że PKC β II wyizolowana z mitochondriów po I/R ma zachowaną aktywność enzymatyczną. W związku z tym, na podstawie analiz oddziaływań między białkami wytypowano mitochondrialnych partnerów PKC β II. Dla dwóch zidentyfikowanych białek - dehydrogenazy pirogronianowej i mitochondrialnej syntazy ATP wykonano pomiary *in vitro* ich względnej ilości i aktywności po I/R oraz po użyciu inhibitora PKC β II (β IIV5-3). Na podstawie wyników tych doświadczeń nie udowodniono wpływu PKC β II na żaden z badanych enzymów. Dodatkowo zidentyfikowano mitochondrialne metabolomy regionów hipokampa o odmiennej wrażliwości na bodziec I/R, w celu zbadania poischemicznego oddziaływania PKC β II na funkcjonowanie mitochondriów. Wykazano, że mitochondria regionów CA1 i CA2-4, DG różnią się między sobą zawartością metabolitów w próbach kontrolnych, co może przekładać się na ich odmienną wrażliwość na stres niedokrwienno-

reperfuzyjny. W badaniach związków pośrednich cyklu kwasu cytrynowego zaobserwowano, że w mitochondriach CA2-4, DG jest więcej fumaranu i jabłczanu po I/R (w porównaniu do CA1), co może sugerować poischemiczne spowolnienie cyklu w tym regionie. Po zastosowaniu inhibitora PKC β II (β IIV5-3) bezpośrednio po I/R odnotowano, że ilości fumaranu i jabłczanu w mitochondriach obu badanych regionów hipokampa są zbliżone do kontrolnych. Wynik ten sugeruje potencjalne zniesienie poischemicznego działania PKC β II przez inhibitor β IIV5-3 i wskazuje, że na poziomie metabolitów mitochondria regionów CA1 i CA2-4, DG odpowiadają podobnie na I/R połączoną z podaniem inhibitora β IIV5-3.

Na podstawie zaprezentowanych wyników proponuję, że to właśnie indukowana poprzez I/R translokacja PKC β II do mitochondriów, jest pierwszym etapem/czynnikiem uruchamiającym endogenne mechanizmy neuroprotektoryjne w regionie CA2-4, DG hipokampa. Prawdopodobnie PKC β II po I/R oddziałuje z białkami mitochondrialnymi, zmienia ich funkcjonowanie, wpływa na zmiany ilości metabolitów mitochondrialnych i w ten pośredni sposób umożliwia przeżycie komórkom nerwowym w obszarze CA2-4, DG. Do tej pory nie udało się zidentyfikować mechanizmu inicjowanego przez PKC β II, ale wydaje się, że jednym z jego elementów jest spowolniony metabolizm w mitochondriach CA2-4, DG, który powoduje, że stają się one odporne na uszkodzenie ischemiczno-reperfuzyjne. Przedstawione wyniki badań dostarczają nowych informacji niezbędnych do rozwikłania zagadki neuroprotektoryjnego mechanizmu działania PKC β II w mitochondriach po I/R. Jednak dalsze badania są potrzebne do lepszego zrozumienia obserwowanych zjawisk. Dogłębne zrozumienie tego mechanizmu może w przyszłości przyczynić się do zaprojektowania nowych sposobów leczenia, polegających na minimalizowaniu skutków niedokrwienia mózgu, opartych na wzmocnieniu endogennej, neuroprotektoryjnej odpowiedzi komórkowej wyzwalanej w mitochondriach.

3. Abstract

This thesis concerns the pathology of brain ischemia and it is focused, in particular, on molecular mechanisms of ischemia-reperfusion (I/R) signal transduction in a cell. It is believed that the metabolic state of mitochondria plays a crucial role in postischemic processes, which may lead either to death or to survival of cells (Sims and Muyderman 2010, Jackson et al. 2018). Due to this fact, mitochondria may become a target of neuroprotection therapy. Recent papers indicate a potential involvement of protein kinases C (PKC) in maintaining mitochondria, which can influence cell fate after I/R. PKC belong to an enzyme family, which phosphorylates serine and threonine residues of proteins. The reaction enables kinases to regulate proteins, which in turn can affect cell functioning such as its growth or regulation of transcription (Nishizuka 1986, 1992, 1995, Asaoka et al. 1992, Dekker and Parker 1994). The majority of PKC are activated by translocation of the enzyme from cytoplasm to cellular membranes. Extracellular signals and intracellular activators can influence selective translocation of respective PKC to various cell compartments (Shirai et al. 1998). Ischemia-reperfusion stress is one of the PKC activators, which induces translocation of these enzymes to mitochondria, among other cell compartments (Kowalczyk et al. 2009, 2012, Budas et al. 2010, Zheng et al. 2011, Sun et al. 2013). Studies of postischemic translocation of PKC indicate: role of PKC ϵ in apoptosis, function of PKC δ in ischemic preconditioning of heart (Churchill i Mochly-Rosen 2007, Budas et al. 2010) and a potential involvement of PKC α and β in regulation of mitochondrial metabolism (Nowak and Bakajsova 2012, 2015, Kowalczyk et al. 2012).

Our previous results presented that transient ischemia-reperfusion episode of gerbil brain caused the enhancement of PKC β immunoreactivity in mitochondria isolated from the ischemia-resistant part of hippocampus – CA2-4, DG. Additionally, we showed that inhibition of PKC β activity led to an increase in excitotoxic injury in rat organotypic hippocampal slices (Kowalczyk et al. 2012). These results suggest a potential, neuroprotective properties of PKC β , which is consistent with other findings demonstrating the protective role of kinase in hypoxic preconditioning models of the mouse brain (Niu et al. 2005, Bu et al. 2011).

The aim of my research was to verify a hypothesis about a role of PKC β in endogenous neuroprotection after transient brain ischemia and to unveil a mechanism of the kinase in mitochondria.

To verify the hypothesis about the potential function of PKC β in processes enabling cell survival, we used two acknowledged experimental models, which are commonly used in brain ischemia research: *in vivo* – bilateral, 5-min. occlusion of common carotid arteries of Mongolian gerbil and *in vitro* – excitotoxicity in rat organotypic hippocampal slice culture. A selective injury of neurons in CA1 region of hippocampus is seen in both experimental models after usage of distinct stress stimulus (I/R or excitotoxicity). Simultaneously, CA2-4, DG structure is preserved.

In my studies I demonstrated that a PKC β II isoform (not PKC β I) turned out to be the one whose immunoreactivity increased in mitochondrial fraction isolated from the resistant part of hippocampus - CA2-4, DG after transient brain ischemia in gerbil. I proved that the observed postischemic immunoreactivity enhancement of PKC β II in mitochondria resulted from translocation of the kinase from cytosol to mitochondria. Moreover, mitochondrial matrix localization of PKC β II was revealed after I/R. That is interesting, because the kinase does not have a classical amino acid sequence targeting proteins to mitochondria, which means that translocation of PKC β II to mitochondria is subject to a non-classical translocation pathway. Then, I used a peptide inhibitor of PKC β II (β IIV5-3), which augmented the neuron injury triggered by excitotoxic stress in *in vitro* model and I/R in *in vivo* model. These results suggested a neuroprotective function of PKC β II, whose mechanism was studied in the subsequent stage of the project. It was proved that PKC β II isolated from mitochondria preserved its enzymatic activity after I/R. Due to this fact, I identified mitochondrial protein partners of PKC β II on the basis of a protein-protein interaction analysis. Relative quantity and activity of pyruvate dehydrogenase and mitochondrial ATP synthase were measured in samples obtained after I/R and after PKC β II inhibitor (β IIV5-3) administration. The influence of PKC β II on the enzymes was not proved based on the results of the above measurements. Moreover, the mitochondrial metabolomes of hippocampal regions with distinct sensitivity on I/R were identified in order to reveal the postischemic PKC β II impact on mitochondria. I indicated that mitochondria of CA1 and CA2-4, DG differ in content of metabolites in control samples, which may translate into their diverse vulnerability to ischemia-reperfusion stress. During the studies of the citric acid cycle intermediates I observed that there was more fumarate and malate in mitochondria of CA2-4, DG region (in comparison to CA1) after I/R. It may suggest a postischemic retardation of the cycle in this region. The amounts of fumarate and malate became similar in mitochondria from both hippocampal regions after PKC β II inhibitor (β IIV5-3) administration. It may indicate an abolition of postischemic PKC β II functioning by the inhibitor and it shows that, on the

metabolite level mitochondria from CA1 and CA2-4, DG respond similarly to I/R connected with the inhibitor application.

In summary, I suggest that the PKC β II translocation to mitochondria induced by I/R is the first phase/factor triggering the endogenous neuroprotective mechanism in the CA2-4, DG region of hippocampus. Probably, PKC β II interacts with mitochondrial proteins after I/R, changes their functions, influences the quantity of metabolites and by this indirect way it enables cell survival in the CA2-4, DG region of hippocampus. So far though, the mechanism initiated by PKC β II has not been revealed, but it seems that the decreased metabolism in mitochondria of CA2-4, DG may constitute one of its elements, which causes mitochondria to become resistant to I/R injury. My results provide new information essential for deciphering the puzzle of the neuroprotective PKC β II mechanism in mitochondria after I/R. However, other studies are crucial for a better understanding of the observed phenomenon. Profound comprehending of the mechanism may establish a basis for the design of new stroke therapies relying on the enhancement of the endogenous, neuroprotective cell response triggered in mitochondria.

4. Innowacyjność rozprawy

Temat badawczy podjęty w poniższej pracy doktorskiej wpisuje się w światowy trend badań ukierunkowanych na poszukiwanie endogennych czynników neuroprotekcyjnych. Rozprawa, mimo, że porusza temat, eksplorowanych od dawna, zjawisk współwystępujących z niedokrwieniem mózgu, jest oryginalna ze względu na skierowanie uwagi na dotąd nieznany skutek I/R jakim jest translokacja PKC β II do mitochondriów w regionie hipokampa mało wrażliwym na niedokrwienie.

Ustalenia rozprawy wykraczające poza aktualną wiedzę literaturową:

- Dowiedziono, że PKC β II jest tą izoformą PKC β , która może mieć związek z przeżyciem komórek w regionie hipokampa mało wrażliwym na niedokrwienie - CA2-4, DG.
- Dzięki zastosowaniu nowatorskiego narzędzia jakim jest peptydowy inhibitor translokacji PKC β II - β IIV5-3 wykazano, że (1) obserwowany poischemiczny wzrost immunoreaktywności PKC β II w mitochondriach jest wynikiem przemieszczenia się tej kinazy z cytosolu do mitochondriów w warunkach reperfuzji, (2) zahamowanie poischemicznego przemieszczenia PKC β II do mitochondriów powoduje pogłębienie uszkodzenia wywołanego I/R w modelu *in vitro* i *in vivo*.
- Wykazano obecność PKC β II w macierzy mitochondrialnej, chociaż mechanizm transportu przez błony mitochondrialne nie jest znany.
- Wytypowano dotąd nieznanymi białkowymi, mitochondrialnymi partnerów oddziałujących z PKC β II.
- Do tej pory nie udało się zidentyfikować mechanizmu inicjowanego przez PKC β II, ale wydaje się, że jednym z jego elementów jest spowolniony metabolizm w mitochondriach CA2-4, DG, który powoduje, że stają się one odporne na uszkodzenie ischemiczno-reperfuzyjne.

Ponadto wydaje się, że obserwacje opisane w poniższej pracy doktorskiej mogą posłużyć do wyznaczenia nowych kierunków badań naukowych.

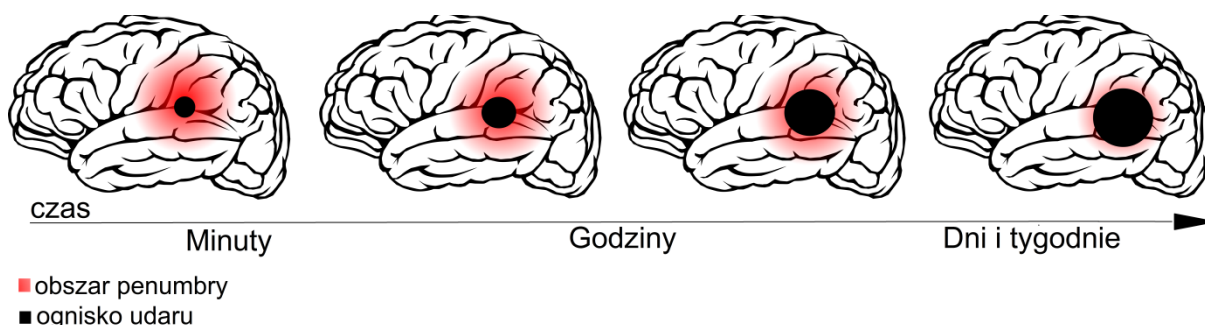
5. Wstęp

Poniższa praca doktorska jest osadzona w tematyce badań patologii niedokrwiennej mózgu i dotyczy molekularnych mechanizmów rozprzestrzeniania się sygnału ischemiczno-reperfuzyjnego (I/R) w komórce. Obecnie, korzystając ze zwierzęcego modelu niedokrwienia u myszokoczka mongolskiego (*Meriones unguiculatus*), koncentrujemy się na poznaniu roli różnych izoform kinaz białkowych C (PKC) związanych z mitochondriami, w procesach prowadzących do poischemicznej eliminacji neuronów oraz w endogennej neuroprotekcji. W tym modelu, krótkotrwałe podwiązanie tętnic szyjnych i następująca reperfuzja powodują selektywną śmierć neuronów w regionie CA1 hipokampa, natomiast żywotność neuronów w regionie CA2-4, DG pozostaje zachowana. W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że krótkotrwała I/R mózgu powoduje zwiększenie immunoreaktywności kinazy białkowej C β (PKC β) jedynie w mitochondriach regionu hipokampa odpornego na uszkodzenie – CA2-4, DG (Kowalczyk i wsp. 2012). Na tej podstawie można wysnuć hipotezę o związku poischemicznej, wzmocnionej immunoreaktywności PKC β w mitochondriach z endogennym mechanizmem neuroprotektynym uruchamianym w regionie CA2-4, DG. Stąd też, celem obecnej pracy było zbadanie konsekwencji i sensu biologicznego występowania PKC β w mitochondriach po I/R.

5.1 Rodzaje niedokrwienia mózgu

Niedokrwienie mózgu spowodowane nagłym zmniejszeniem lub zatrzymaniem dopływu krwi do mózgu powoduje zaburzenia transportu substratów energetycznych, wymiany gazowej (tlen i dwutlenek węgla) oraz innych metabolitów. Nieprawidłowości te prowadzą do zaburzenia homeostazy, a nawet śmierci komórek. Wyróżnia się dwa rodzaje niedokrwienia mózgu: ogniskowe oraz całkowite. Ogniskowe niedokrwienie mózgu (niedokrwienno-udar mózgu) to nagle, naczyniopochodne uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego (Sacco i wsp. 2013) wynikające z zatrzymania dopływu krwi do tego narządu na skutek zwężenia naczyń, zatoru lub zakrzepu. Przyczyny tych nieprawidłowości są liczne i niejednorodne. Zaburzenia te mogą nastąpić wskutek m.in.: migotania przedsionków serca, miażdżycy czy włóknienia i szklwienia małych naczyń krwionośnych (Adams i wsp. 1993). Niedokrwienno-udar mózgu charakteryzuje się obecnością tzw. ogniska będącego obszarem martwiczym, którego centralnym miejscem jest niedrożne naczynie oraz obwodowej strefy tzw. półcienia (penumbry), która jest niedostatecznie zaopatrywana w krew. Upośledzony przepływ krwi uniemożliwia podtrzymanie aktywności elektrycznej w strefie półcienia, ale jest wystarczający do utrzymania aktywności kanałów jonowych komórek (Ramos-Cabrer i wsp. 2011). Wraz z upływem czasu penumbra może stać

się obszarem martwiczym (Ryc. 1), co spowodowane jest rozprzestrzenianiem się biochemicznych sygnałów z ogniska udaru do penumbry. Może to prowadzić do śmierci komórek oraz długotrwałych zaburzeń w zaopatrywaniu komórek w substraty metaboliczne (Dirnagl i wsp. 1999).



Ryc. 1 Postępujące w czasie powiększanie się obszaru martwiczego spowodowanego ogniskowym niedokrwieniem mózgu, na podstawie Dirnagl i wsp. 1999.

Przyczyną całkowitego niedokrwienia mózgu jest obniżony przepływ krwi w naczyniach mózgowych towarzyszący zatrzymaniu krążenia, najczęściej na skutek zatrzymania akcji serca lub wzrostu ciśnienia wewnątrzczaszkowego przekraczającego ciśnienie tętnicze. W wyniku zwolnionego lub braku zaopatrzenia całego mózgu w tlen i substancje odżywcze, dochodzi do wybiórczej śmierci neuronów w szczególnie wrażliwych obszarach mózgu takich jak: region CA1 hipokampa, kora nowa, wzgórze, mózdzek i zwoje podstawne (Sanganalmath i wsp. 2017). Jednak szkodliwe skutki niesie ze sobą nie tylko sama ischemia, ale również okres przywrócenia krążenia, tzw. reperfuzja, która może być szkodliwa dla komórek nerwowych ze względu na wywołanie stresu oksydacyjnego i reakcji zapalnej (White i wsp. 1996, Harukuni i Bhardwaj 2006) - stąd często mówi się o uszkodzeniu ischemiczno-reperfuzyjnym.

Udar niedokrwienny mózgu jest drugą główną przyczyną śmierci na całym świecie (WHO, 2017). Udar mózgu powoduje trwałą niepełnosprawność u 25-50% chorych (Hankey i wsp. 2002, Jönsson i wsp. 2014, Yang i wsp. 2016), co wiąże się ze znaczącym obniżeniem jakości ich życia. Oprócz poważnych skutków zdrowotnych, udar mózgu wpływa na aspekty społeczne (utrata dotychczasowego statusu społecznego, obniżenie stopy życiowej, izolacja) i ekonomiczne (sytuacja zawodowa, koszty hospitalizacji i dalszego leczenia). W związku z tym ciągle poszukiwane są nowe metody terapeutyczne zapobiegające skutkom niedokrwienia mózgu.

5.2 Leczenie w ischemii mózgu

Kierunkami, które obecnie są rozwijane w zakresie leczenia niedokrwiennego udaru mózgu są: reperfuzja oraz hamowanie niekorzystnych przemian biochemicznych w komórkach

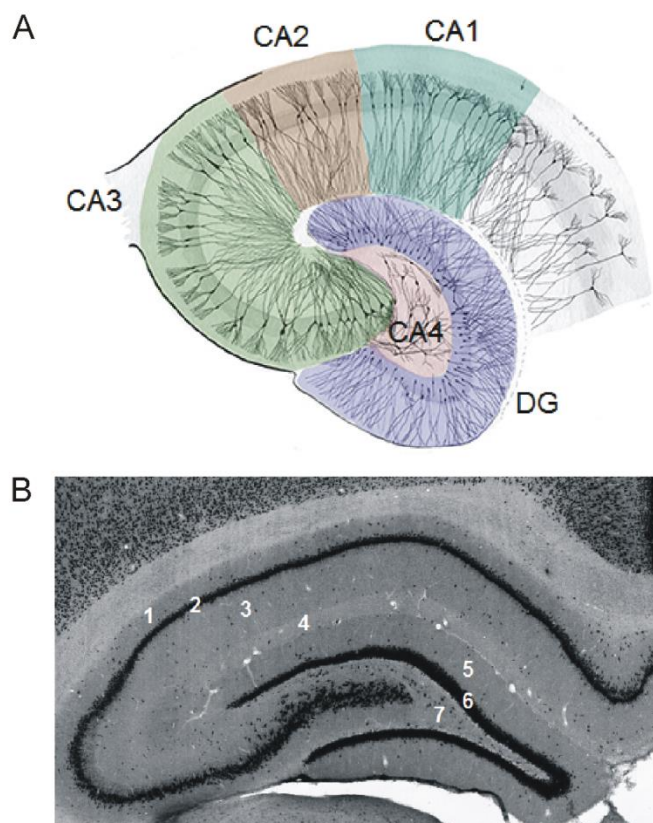
nerwowych – neuroprotekcja (Green i Shuaib 2006). Do leczenia przyczynowego w niedokrwiennym udarze mózgu zalicza się leczenie trombolityczne rozpuszczające skrzep (rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu, rt-PA) czy antyagregacyjne - hamujące narastanie zakrzepu w naczyniach (kwas acetylosalicylowy). Hipotermia daje również nadzieję na zahamowanie skutków I/R (Macleod i wsp. 2010) i jest skuteczna, jeśli zastosowana jest natychmiast po wystąpieniu pierwszych objawów epizodu niedokrwiennego (Han i wsp. 2015, Tahir i Pabaney 2016). Jednak obecnie najskuteczniejszą metodą wydaje się być trombektomia, czyli mechaniczne usunięcie skrzepliny blokującej naczynie (Kobayashi i wsp. 2016). Ponadto stosuje się leczenie ogólne mające na celu kontrolę i stabilizację funkcji życiowych pacjenta (Szermer i Szczudlik 2007, Słowik 2016). Stosowane w klinice leczenie ma jednak swoje ograniczenia i tak na przykład jedynie ok. 10% chorych z udarem niedokrwiennym mózgu objętych jest leczeniem rt-PA ze względu na liczne kryteria wykluczenia z leczenia oraz wąskie okno terapeutyczne (do 4,5 godzin od wystąpienia objawów udaru). W związku z niewielką liczbą skutecznych terapii wciąż trwają poszukiwania nowych metod leczenia. Od połowy XX wieku rozwijane są badania mające na celu wypracowanie terapii neuroprotektoryjnej, która umożliwiłaby ograniczenie obszaru uszkodzenia, wydłużenie okna terapeutycznego, a co za tym idzie przeżycie komórek nerwowych obszaru penumbry (Pera 2007). W oparciu o wiedzę dotyczącą poischemicznych procesów prowadzących do uszkodzenia komórek, badano liczne substancje m. in.: wymiatacze wolnych rodników, czynniki neurotroficzne, modulatory kanałów jonowych, antagonistów receptorów NMDA, stabilizatory błon komórkowych, substancje przeciwzapalne i antyapoptotyczne (Muir i Teal 2005, Członkowska 2008). Jednak dotychczas żaden z testowanych związków nie przeszedł wszystkich faz badań klinicznych i nie został dopuszczony do użycia (Chamorro i wsp. 2016, Tymianski 2017). Innym, obiecującym kierunkiem badań wydaje się być rozwój terapii neuroprotektoryjnej (Lo 2008, Savitz i wsp. 2017), opierającej się na wzmocnieniu endogennej adaptacyjnej odpowiedzi komórek nerwowych (Leker i Shohami 2002, Moskowitz i wsp. 2010, Zhao i Willing 2018). Jednak badanie wewnętrznych procesów neuroprotektoryjnych w mózgu stanowi wyzwanie, ponieważ konkurują one z procesami prowadzącymi do śmierci komórki i w związku z tym często występują równocześnie z nimi w przebiegu ischemii i reperfuzji. Istnienie regionów mózgu o różnej wrażliwości na bodziec niedokrwiennie-reperfuzyjny (np. regiony CA1 i CA2-4, DG hipokampa) umożliwia w pewnym stopniu „oddzielenie” tych procesów od siebie i tym samym ułatwia ich poznanie. Rozszyfrowanie różnic w biochemii tych regionów może przyczynić się do lepszego zrozumienia zdolności komórek do przeżycia po I/R.

5.3 Wybiórcza wrażliwość na sygnał ischemiczno-reperfuzyjny na przykładzie hipokampa

Hipokamp stanowi część układu limbicznego mieszczącą się w płacie skroniowym kresomózgowia każdej z półkul mózgu (Insausti 1993). U człowieka hipokamp odpowiada za konsolidację informacji z pamięci krótkotrwałej do długotrwałej oraz za pamięć przestrzenną umożliwiającą poruszanie się w środowisku (Amaral i Lavenex 2007). Uszkodzenie tego regionu mózgu, będące skutkiem chorób neurodegeneracyjnych, zaburzeń psychicznych czy fizjologicznego procesu starzenia, może prowadzić do zaburzenia lub utraty funkcji poznawczych takich jak pamięć kontekstowa i epizodyczna czy umiejętność uczenia się (Zola-Morgan i Squire 1986, Rajah i wsp. 2010).

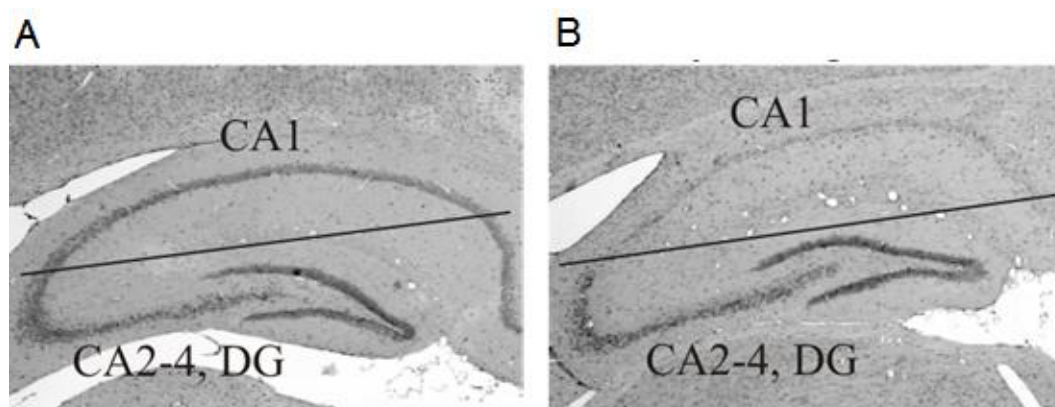
Głównymi strukturami tworzącymi hipokamp są: zakręt zębaty (łac. *gyrus dentatus*, DG), hipokamp właściwy (róg Amona, łac. *cornu Ammoni*, CA) i podpora. W zależności od budowy i rozmieszczenia neuronów piramidowych, wyróżnia się w obrębie hipokampa cztery pola cytoarchitektoniczne CA1-CA4 (Anderson i wsp. 2007, Ryc. 2 A). Hipokamp ma charakterystyczną budowę kilkuwarstwową. W regionie DG mieszczą się następujące warstwy komórek - drobinowa, ziarnista i komórek różnokształtnych, a w regionach CA – początkowa, piramidalna, promienista i jamisto-drobinowa (Sawicki i Malejczyk 2012, Ryc. 2 B).

Neurony hipokampalne wykazują zróżnicowaną wrażliwość na uszkodzenie ischemiczne. Region CA1 hipokampa charakteryzuje szczególna podatność na skutki niedokrwienia, zaś zakręt zębaty, przy ekspozycji na taki sam bodziec uszkodzający, zachowuje swoją strukturę. Zjawisko występowania szczególnej podatności danego obszaru mózgu na niedokrwienie nazywane jest „wybiórczą wrażliwością” (Kirino 1982, Pulsinelli i wsp. 1982, Kirino i wsp. 1984, Grain i wsp. 1988). Już po 5-minutowym niedokrwieniu mózgu myszokoczka mongolskiego część neuronów regionu CA1 hipokampa wykazuje zmienioną morfologię. Obserwuje się: spęczniałe mitochondria z nieprawidłowymi grzebieniami, rozerwane błony komórkowe, uszkodzone mikrotubule (Yamamoto i wsp. 1986). Po 4 dniach od wystąpienia niedokrwienia, jądra neuronów CA1 stają się pyknotyczne, a same komórki – obkurczone (Suzuki i wsp. 1983), ponadto zakończenia postsynaptyczne są na zaawansowanym etapie degradacji. Widoczne są także komórki fagocytarne usuwające pozostałości martwych komórek (Kirino 1982).



Ryc. 2 Podział hipokampa na regiony i jego warstwowa budowa. (A) Lorente de No (1934) na podstawie obserwacji skrawków barwionych metodą Golgi-Cox-Niss wyróżnił regiony CA1-4 i zakręt zębaty (DG) w hipokampie. Na podstawie: Larriva-Sahd 2014. (B) Budowa warstwowa hipokampa. Numerami oznaczono warstwy komórek regionów CA: (1) początkowa, (2) piramidalna, (3) promienista, (4) jamisto-drobinowa oraz regionu DG: (5) drobinowa, (6) ziarnista, (7) komórek różnokształtnych. Barwienie NeuN. Na podstawie: Kjonigsen i wsp. 2011.

Po tygodniu od epizodu ischemicznego obserwuje się znacznie zmniejszoną liczbę żywych komórek w obrębie CA1 hipokampa (Ryc. 3) (Kirino 1982, Suzuki i wsp. 1983, Kowalczyk i wsp. 2012). To zjawisko nosi miano opóźnionej śmierci neuronów, ze względu na to, że obraz morfologiczny świadczący o jej zajściu obserwowany jest dopiero w okresie kilku dni po uszkodzeniu niedokrwinnym (Kirino 1982, Petito i Pulsinelli 1984). Zaawansowanie zmian morfologicznych oraz szybkość ich pojawienia się są zależne od nasilenia epizodu ischemiczno-reperfuzyjnego. Ito i wsp. (1975) odnotowali, że po stosunkowo krótkotrwałym (15 min) niedokrwieniu mózgu zmiany morfologiczne rozwijają się powoli i pojawiają się w późniejszym okresie po niedokrwieniu (kilka dni), podczas gdy dłuższe czasy (1, 3, 6 godzin) niedokrwienia charakteryzują się szybką manifestacją objawów. Opisane zjawisko nazwali dojrzewaniem uszkodzenia neuronów (ang. *maturation phenomenon*).



Ryc. 3 Porównanie hipokampów wyizolowanych od zwierząt kontrolnych (A) i poddanych 7 dniowej reperfuzji po 5-min ischemii (B). Na zdjęciu B w regionie CA1 widoczny jest ubytek komórek nerwowych. Źródło: Kowalczyk i wsp. 2012.

Opóźniona, selektywna śmierć neuronów regionu CA1 hipokampa występuje również u innych gatunków takich jak: mysz (Rytter i wsp. 2003), szczur (Ordy i wsp. 1993, Sugawara i wsp. 1999), pies (Sieber i wsp. 1997), makak (Bodsch i wsp. 1986) czy człowiek (Petito i wsp. 1987, Horn i Schlote 1992), co może sugerować podobieństwo w rozwoju uszkodzenia ischemiczno-reperfuzyjnego u różnych gatunków.

Mimo licznych badań próbujących rozwikłać zagadkę selektywnej, opóźnionej poniedokrwiennnej śmierci neuronów części CA1 hipokampa, do tej pory nie otrzymano jednoznacznej odpowiedzi co do podłoża tego zjawiska. Pierwsze teorie na temat jego etiologii powstały już w pierwszej połowie ubiegłego wieku i opowiadały się za różnicami w ukrwieniu regionu CA1 w porównaniu do reszty hipokampa oraz za odmiennymi właściwościami fizjologicznymi i biochemicznymi neuronów tego regionu (Schmidt-Kastner i Freund 1991). Z czasem dowiedziono, że między regionami hipokampa występują różnice w metabolizmie energetycznym, tworzeniu reaktywnych form tlenu, odpowiedzi na zwiększenie stężenia Ca^{2+} , czy wrażliwości na glutaminian (Michaelis 2012). Dzięki analizom transkryptomocznym wykazano różnicę w ekspresji genów w hipokampie. W regionach mniej wrażliwych na stres występuje wyższa ekspresja genów związanych z przemianami energetycznymi, przekazywaniem sygnału, rozwojem układu nerwowego i transmisją synaptyczną, zaś w regionie wrażliwym – genów związanych z naprawą uszkodzeń DNA i RNA, odpowiedzią immunologiczną i procesami zapalnymi (Wang i wsp. 2009). Mimo wyżej wymienionych obserwacji nie rozstrzygnięto ostatecznie jakie mechanizmy molekularne determinują los komórek różnych regionów hipokampa. Dotychczas otrzymane wyniki stanowią podstawę do dalszych rozważań o endogennych różnicach między wrażliwymi i odpornymi na niedokrwienie regionami hipokampa.

5.4 Poischemiczne zmiany biochemiczne współwystępujące z uszkodzeniem komórek

Liczne ścieżki metaboliczne uruchamiane po epizodzie ischemicznym mózgu często krzyżują się, a ponadto mogą występować w różnym czasie po I/R i w różnych regionach – na przykład niektóre ograniczają się do ogniska udaru, inne obejmują zarówno ognisko jak i strefę półcienia, mogą występować równocześnie, dwukrotnie w odstępie czasu lub następować po sobie. Są to procesy zarówno prowadzące do śmierci, jak i do przeżycia komórek. Na podstawie wieloletnich badań do głównych elementów uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego zalicza się: wyczerpanie substratów energetycznych, ekscytotoksyczność, stres oksydacyjny oraz dysfunkcję mitochondriów (Uchino i wsp. 2015, Granger i Kvietyš 2017).

Tkanka nerwowa charakteryzuje się wysokim zużyciem glukozy oraz tlenu i jest prawie całkowicie zależna od ATP wytwarzanego w procesie fosforylacji oksydacyjnej. Odpowiednia podaż ATP zapewnia utrzymanie prawidłowego funkcjonowania komórek. Niedokrwienie mózgu hamuje syntezę ATP, ponieważ warunki beztlenowe uniemożliwiają utlenienie NADH i przeniesienie równoważników redukcyjnych na cząsteczkę O_2 . W takiej sytuacji pirogronian nie jest transportowany do mitochondriów, lecz służy jako substrat w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę mleczanową, w wyniku której powstają NAD^+ i mleczan. Odtworzenie NAD^+ podtrzymuje proces glikolizy i syntezy ATP w warunkach deficytu tlenu. Jednak ten proces nie pokrywa zapotrzebowania energetycznego komórek nerwowych i glejowych. Ponadto zwiększenie stężenia kwasu mlekowego powoduje obniżenie pH w komórce (Bender i Mayes 2008), co może aktywować lipazy i proteazy (Siesjö i wsp. 1990). Niewystarczające stężenie tlenu uniemożliwiające utlenienie NADH oraz zahamowanie wymiany jonów Na^+ i H^+ przez błonę komórkową powodują utrzymanie niskiego pH w komórce po epizodzie ischemicznym (Pirttilä i Kauppinen 1992).

Obniżenie stężenia ATP podczas ischemii powoduje, że pompy jonowe Na^+/K^+ zależne od ATP przestają działać prawidłowo. W niekontrolowany sposób do komórek napływa sód, a następnie woda, co w efekcie powoduje ich obrzęk (Zemke i wsp. 2004). Zachwiana równowaga jonowa powoduje utratę potencjału błonowego. Przyczynia się to do niekontrolowanego przenikania jonów, w tym Ca^{2+} , do wnętrza komórek. W związku z dezaktywacją pomp jonowych dochodzi do gromadzenia się jonów wapnia w cytoplazmie komórki. Tam mogą one działać jak cząsteczki sygnałowe i wywoływać m.in. uwalnianie pobudzających aminokwasów (głównie glutaminianu) z komórek. Procesy zależne od ATP, takie jak wychwytywanie aminokwasów z przestrzeni synaptycznej, są zahamowane, czego skutkiem jest wzrost stężenia zewnątrzkomórkowego glutaminianu, który pobudza kolejne komórki - aktywuje

ich receptory wrażliwe na glutaminian i powoduje otwarcie kanałów jonowych umożliwiając napływ jonów wapnia. Niefizjologiczne stężenie Ca^{2+} w komórkach związane ze zjawiskiem ekscytotoksyczności prowadzi do tworzenia reaktywnych form tlenu, stałej aktywacji enzymów wrażliwych na Ca^{2+} (m.in. kinazy białkowe C, proteazy, fosfolipazy i nukleazy) i dalszego uwalniania kwasu glutaminowego. Enzymy hydrolityczne mogą prowadzić do bezpośredniego uszkodzenia struktur komórkowych, zaś wolne rodniki tlenowe zaburzają prawidłowe funkcjonowanie komórki poprzez peroksydację lipidów błony komórkowej i organelli, modyfikację białek, utlenienie DNA czy aktywację metaloproteinaz i kalpain (Dirnagl i wsp. 1999, Strosznajder 2005, Kalogeris i wsp. 2012).

Ze względu na liczne funkcje pełnione przez mitochondria, takie jak synteza ATP, przekazywanie sygnałów, kontrola cyklu komórkowego, udział w utrzymaniu homeostazy wapnia, wzrost komórki i apoptoza (McBride i wsp. 2006), są one szczególnym ogniwem w sekwencji zdarzeń występujących w epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym mózgu. Tak jak wspomniano wcześniej, niedokrwienie działa hamująco na przepływ elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, co jest przyczyną „przełączenia” komórek na metabolizm beztlenowy i akumulacji mleczanu do toksycznych stężeń – powyżej 15-25 $\mu\text{M/g}$ mokrej masy mózgu (Rehncrona i wsp. 1980, Siesjö i wsp. 1990, Zemke i wsp. 2004). Ponadto, syntaza ATP zaczyna działać w kierunku hydrolizy ATP, co przez krótki czas umożliwia utrzymanie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej (Takeda i wsp. 2004). W wyniku tych zdarzeń ATP wyczerpuje się już w pierwszych minutach ischemii (Lust i wsp. 1985). Podczas epizodu niedokrwienego przekaźniki łańcucha oddechowego występują w formie zredukowanej, czego skutkiem jest rosnące stężenie anionorodnika nadadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot-}$) przekraczające wydajność antyoksydacyjnych systemów komórkowych, co w efekcie prowadzi do uszkodzenia struktur komórkowych (Fiskum 2000, Dirnagl i wsp. 2003).

Ponowne natlenowanie tkanki jest krytyczne dla jej dalszego losu. Paradoksalnie, z przywróceniem krążenia wiąże się zwiększenie stresu oksydacyjnego. Uszkodzone podczas ischemii kompleksy łańcucha oddechowego nie działają prawidłowo i są potencjalnym źródłem wolnych rodników tlenowych, zaś zmniejszona po ischemii ilość i/lub aktywność „wymiataczy” reaktywnych form tlenu (takich jak dysmutaza nadadtlenkowa czy katalaza) jest niewystarczająca do ochrony komórki (Schaller i Graf 2004). W fazie reperfuzy podwyższone stężenie reaktywnych form tlenu przyczynia się do zwiększenia częstotliwości występowania uszkodzeń w mitochondrialnym DNA i/lub jego rearanzacji, czego skutkami są pogłębienie kryzysu energetycznego oraz aktywacja odpowiedzi immunologicznej (Kalogeris i wsp. 2014, Chouchani i wsp. 2016). Reaktywne formy tlenu, obok wysokiego stężenia wolnych jonów wapnia, mogą

przyczyniać się do rearanżacji elementów mitochondrialnego megakanalu (MPTP) w okresie reperfuzji (Siesjö i wsp. 1999, Borutaite i wsp. 2013). Zatem, MPTP umożliwia niekontrolowany ruch protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej i jej depolaryzację. Zwiększenie przepuszczalności błon mitochondrialnych powoduje pęcznienie tych organelli, podwyższenie ciśnienia osmotycznego, rozprzęgnięcie fosforylacji oksydacyjnej i ostatecznie prowadzi do przerwania zewnętrznej błony mitochondrialnej (Halestrap i wsp. 2007, Bakthavachalam i Shanmugam 2017). Rozszczelnienie błon mitochondrialnych powoduje uwolnienie białek mitochondrialnych, m.in. cytochromu c, do cytoplazmy, co może prowadzić do uruchomienia kaskady apoptozy i uszkodzenia komórki (Eldadah i Faden 2000, Broughton i wsp. 2009).

5.5 Endogenna neuroprotekcja

Uruchamiane przez epizod ischemiczny naturalne procesy prowadzące do ochrony komórek, tzw. endogenna neuroprotekcja, są znacznie słabiej poznane niż procesy degeneracyjne, ponieważ ich przejawy są subtelniejsze. Niemniej jednak postulowany jest udział pewnych mechanizmów lub cząsteczek, które mogą być aktywowane w okresie ograniczonego ukrwienia w penumbrze lub w regionach mózgu mniej podatnych na stres niedokrwienny.

Jednym z takich mechanizmów jest zwiększenie ekspresji genu i aktywacja czynnika indukowanego hipoksją 1 (HIF-1) w całym mózgu osesków szczura po prekondycjonowaniu ischemicznym (PI; czyli po poddaniu mózgu nieuszkodzającym epizodom niedokrwienia prowadzącym do wytworzenia tolerancji mózgu na uszkodzający epizod niedokrwienny). HIF-1 oddziałując z DNA indukuje ekspresję genów kodujących: transporter glukozy 1 (GLUT1), fosfofruktokinazę 1 (PFK), dehydrogenazę aldehydową (ALD) i dehydrogenazę mleczanową (LDH). W związku z tym, że są to białka odpowiadające za utrzymanie prawidłowych zasobów energetycznych w komórce, uważa się, że zwiększenie ich ilości, na skutek działania HIF-1, ma działanie neuroprotekcjne (Jones i Bergeron 2001, Dirnagl i wsp. 2003). W innych badaniach odnotowano zwiększoną ilość mRNA i białka HIF-1 oraz mRNA białek GLUT1, PFK, ALD, LDH w penumbrze, co może wskazywać na uruchomienie w tym obszarze mechanizmów zapobiegających powiększaniu się obszaru martwicy (Bergeron i wsp. 1999). Wskutek hipoksji HIF-1 stymuluje także ekspresję genu erytropoetyny (EPO) w astrocytach, która po uwolnieniu z nich aktywuje neuronalne receptory EPO, które z kolei indukują aktywację kinazy fosfatydyloinozytolowej (PI3K) i kinazy białkowej B (Akt) odpowiedzialnych za fosforylację/inaktywację proapoptotycznego białka mitochondrialnego Bad (Dirnagl i Meisel 2008).

Ischemia powoduje również wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia adenozyiny, która poprzez aktywację receptorów typu A1 hamuje wydzielanie neuroprzekazników pobudzających i dodatkowo powoduje otwieranie presynaptycznych kanałów potasowych zależnych od ATP, co w efekcie prowadzi do hiperpolaryzacji neuronów. Oddziaływania te wpływają na zatrzymanie rozprzestrzeniania się sygnału ischemicznego prowadzącego do śmierci komórek (Heurteaux i wsp. 1995).

Aktywacja ekspresji genu białka antyapoptotycznego - *Bcl2* podczas PI odbywa się poprzez fosforylację białka wiążącego się z elementem odpowiedzi na cAMP (CREB), które następnie oddziałuje z elementem odpowiedzi na cAMP (CRE) znajdującym się w promotorze genu *Bcl2* (Dirnagl i wsp. 2003). W modelu całkowitego niedokrwienia mózgu szczura, przez kilka dni po ischemii, obserwowano podwyższony poziom fosforylacji CREB w regionie hipokampa mało wrażliwym na niedokrwienie - DG w porównaniu do regionu wrażliwego - CA1 (Zemke i wsp. 2004). Co więcej, PI powoduje zwiększenie fosforylacji CREB również w obszarze penumbry (Nakajima i wsp. 2002).

Innym mechanizmem, który może być zaangażowany w endogenną neuroprotekcję jest rozprzęgnięcie mitochondriów, którego efektem jest rozpraszanie energii uwalnianej podczas utleniania substratów energetycznych w mitochondriach. Zjawisko to może mieć pozytywne skutki dla komórki jeśli zachodzi łagodnie, ponieważ wskutek działania tzw. białek rozprzęgających dochodzi do zwolnienia reakcji redukcji nośników łańcucha transportu elektronów, czemu towarzyszy wolniejsze tworzenie wolnych rodników (Jarmuszkiewicz i Woyda-Płoszczyca 2008, Kalogeris i wsp. 2014). Białkami zaangażowanymi w proces rozpręgnięcia są białka rozpręgające (UCP), których fizjologicznymi funkcjami są kontrola równowagi energetycznej w komórce i ochrona przed stresem oksydacyjnym. Wykazano, że nadekspresja UCP2 chroni komórki nerwowe po krótkotrwałym ogniskowym niedokrwieniu mózgu myszy (Mattiasson i wsp. 2003), natomiast u myszy zmodyfikowanych genetycznie *UCP2^{-/-}* obserwowano zwiększenie uszkodzenia (Haines i wsp. 2010). Czynnikiem wywołującym łagodne rozpręgnięcie jest także aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych zależnych od ATP ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$). W modelu całkowitego niedokrwienia mózgu szczura wykazano, że zahamowanie $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ znosi efekty wcześniej indukowanego prekondycjonowania (Raval i wsp. 2007), co prowadzi do uszkodzenia.

Wolne rodniki tlenowe nie tylko uszkadzają elementy komórki, ale również mogą pełnić rolę cząsteczek sygnałowych podczas I/R. Reaktywne formy tlenu aktywują czynnik transkrypcyjny Nrf2, który w wyniku modyfikacji potranslacyjnych (np. fosforylacji zależnej od PKC, czy deacetylacji zależnej od SIRT-1) przemieszcza się z cytoplazmy do jądra

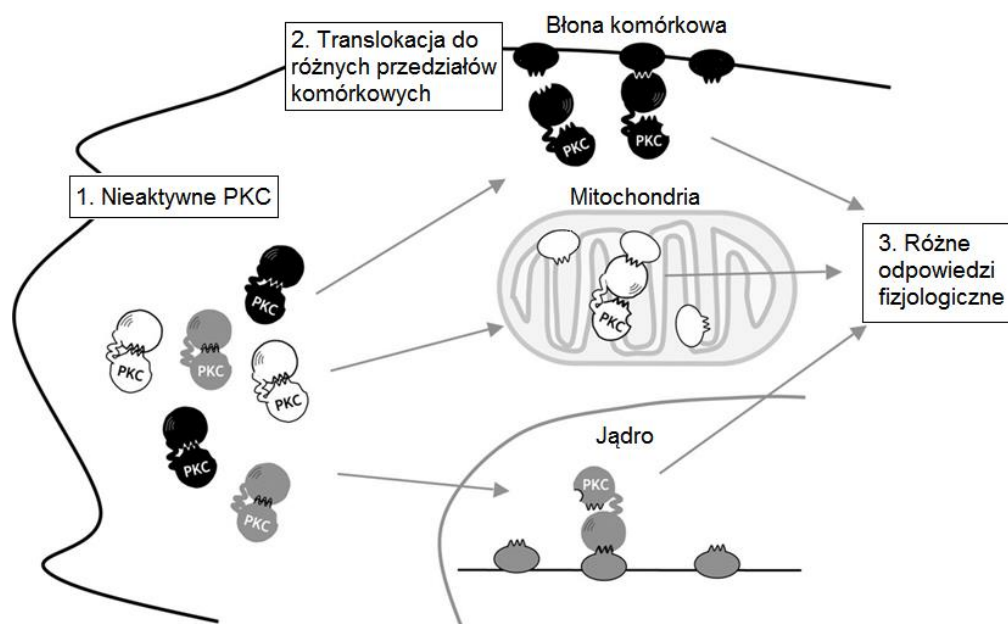
komórkowego. Tam oddziałuje z elementem odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE) i indukuje transkrypcję genów kodujących białka zaangażowane w odpowiedź na stres oksydacyjny, np. syntetazy glutationowej czy katalazy (Thompson i wsp. 2015). Neuroprotektoryjne działanie PI nie było obserwowane w modelu kontrolowanego ograniczenia dostępu tlenu i glukozy (OGD) w komórkach NRF2^{-/-} (Thompson i wsp. 2015). Kolejnym czynnikiem transkrypcyjnym zaangażowanym w procesy ochrony komórek po niedokrwieniu jest przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji - STAT3. Fosforylacja tego białka przez kinazę JAK powoduje jego przemieszczenie się do jądra komórkowego, gdzie STAT3 moduluje ekspresję genów. Ponadto, STAT3 przemieszcza się do mitochondriów, gdzie oddziałuje z I i II kompleksem łańcucha transportu elektronów (Gagliardi i wsp. 1988). Mitochondria pozbawione STAT3 wykazują zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu, zmniejszoną aktywność kompleksu I oraz częstsze otwieranie MPTP (Boengler i wsp. 2010).

Inną klasą cząsteczek biorących udział w procesach endogennej neuroprotekcji są kinazy białkowe C (PKC). Dotychczas najlepiej zbadano ochronną rolę PKCε w prekondukcjonowaniu ischemicznym komórek nerwowych, o czym będzie mowa w następnym podrozdziale.

5.6 PKCβ jako jedno z białek sygnałowych aktywowanych po I/R

Jak już wspomniano, w przebiegu ischemii i reperfuzji dochodzi do aktywacji kinaz białkowych C. Białka te są zaangażowane w różne procesy, takie jak zmiany w strukturze błon biologicznych, regulacja wzrostu i różnicowania komórki, apoptoza czy aktywacja czynników transkrypcyjnych (Newton 1995). Kinazy poprzez fosforylację reszt hydroksylowych seryny i treoniny białek mogą modulować ich aktywność. Rodzina kinaz białkowych C obejmuje trzy grupy enzymów różniące się budową i wrażliwością na sygnały chemiczne: a) klasyczne (α , β I, β II, γ) – mające domeny C1 i C2, wrażliwe na Ca^{2+} , fosfatydyloserynę i diacyloglicerol (DAG); b) nowe (δ , ϵ , θ i η) – mające domeny C1 i zbliżoną do C2, działają niezależnie od zmian stężenia Ca^{2+} ; c) atypowe (ζ , μ i ι/λ) – zawierające skróconą domenę C1, są niewrażliwe na Ca^{2+} i DAG. Aktywacja klasycznych PKC zachodzi dwustopniowo. PKC wiążą wapń, zmieniają konformację umożliwiając przyłączenie się do lipidów, przemieszczają się z cytoplazmy do błon, z którymi oddziałują i w drugim etapie umożliwiają przyłączenie substratu w wyniku odsłonięcia centrum aktywnego i następnie przekazują sygnał (Orr i wsp. 1992, Newton 2018). Przemieszczenie PKC do błon jest cechą charakterystyczną tych enzymów i jest wskaźnikiem ich aktywacji (Kraft i wsp. 1982, Sakai i wsp. 1997). Znane są białka-adaptory, które przez oddziaływanie z PKC determinują ich lokalizację w komórce, położenie w obszarze występowania substratów, czas trwania i amplitudę aktywacji (Schechtman i Mochly-Rosen 2001, Antal i Newton 2013). Do tych

białek zaliczane są m.in. receptory dla aktywnych kinaz białkowych C (ang. *receptor for activated kinase C*, RACK), czy białko 14-3-3 (Mochly-Rosen i wsp. 1991, Kostecky i wsp. 2009). Określone izotypy PKC po otrzymaniu sygnału przemieszczają się do różnych przedziałów komórki, a zatem możliwe jest, że mają one odmienne, charakterystyczne dla siebie mechanizmy działania (Ryc. 4; Huang 1989, Budas i wsp. 2007).



Ryc. 4 Przemieszczanie się PKC do różnych przedziałów komórki jest przyczyną odmiennych reakcji. (1) Po otrzymaniu bodźca nieaktywne PKC, w zależności od izoenzymu, przemieszczają się do różnych przedziałów komórki (2), w których fosforylują występujące tam substraty. Prowadzi to do wywołania różnych odpowiedzi fizjologicznych (3). Miejsce docelowe translokacji danego izoenzymu jest uzależnione od występowania odpowiedniego białka-adaptora np. RACK, które służy PKC jako miejsce zakotwiczenia oraz rusztowanie molekularne. Na podstawie: Budas i wsp. 2007.

PKC występują powszechnie w tkance nerwowej zwierząt należących do różnych i odległych typów taksonomicznych (pierścienice, mięczaki, stawonogi czy strunowce) i ich stężenie jest wyższe niż w innych tkankach (Inoue i wsp. 1977, Kuo i wsp. 1980 Kikkawa i wsp. 1982, Nishizuka 1986). W tkance nerwowej wiele procesów jest wrażliwych na działanie PKC np. uwalnianie neuroprzekaźników, plastyczność synaptyczna, aktywacja kanałów jonowych czy regulacja ekspresji genów (Kaczmarek 1986, Nishizuka 1986, Akers i Routtenberg 1987, Leli i wsp. 1992). Badania dotyczące zmian aktywności PKC podczas epizodu niedokrwienego mózgu nie dają jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o rolę tych kinaz w I/R. Stres niedokrwienno-reperfuzyjny generuje czynniki aktywujące kinazy białkowe C takie jak: jony wapnia, uwolniony z błon diacylglycerol oraz wolne rodniki tlenowe (Perez-Pinzon i wsp. 2005).

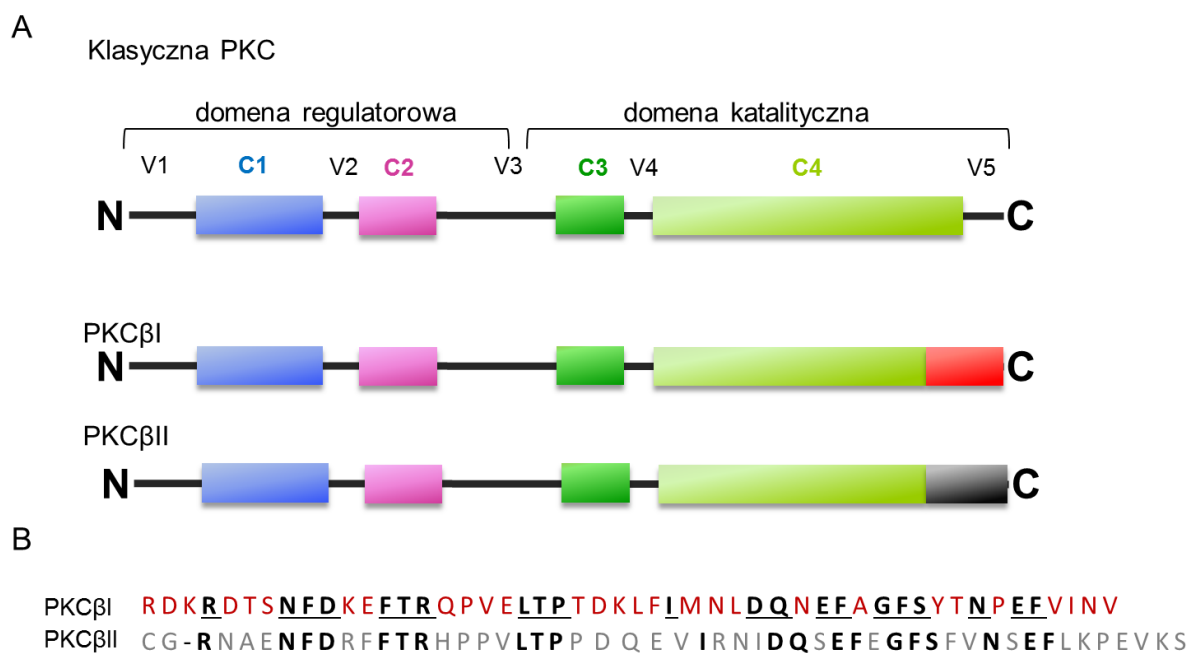
Niektórzy badacze wskazują na zwiększenie aktywności tych enzymów (Kharlamov i wsp. 1993, Selvatici i wsp. 2003) podczas ischemii¹ oraz na ochronne działanie nieselektywnych inhibitorów PKC (Hara i wsp. 1990, Maiese i wsp. 1993, Felipo i wsp. 1993) – sugerując w ten sposób udział PKC w ischemicznym uszkodzeniu komórek nerwowych. Jednak większość danych pokazuje chwilową aktywację i następującą po niej utratę aktywności przez PKC (Crumrine i wsp. 1990, Domańska-Janik i Zalewska 1992, Durkin i wsp. 1996, Chakravarthy i wsp. 1998), współwystępującą z uszkodzeniem komórek podczas ischemii. Z drugiej strony, wykazano, że zastosowanie neuroprotektynnej hipotermii w trakcie niedokrwienia mózgu powoduje podtrzymanie aktywności PKC (Busto i wsp. 1994). Ta obserwacja sugeruje związek aktywności kinaz białkowych C z przeżyciem komórek (Durkin i wsp. 1997). Inna struktura, aktywatory, dystrybucja w komórce oraz różny czas aktywacji po otrzymaniu sygnału mogą powodować, że różne izoformy PKC, mimo że odbierają ten sam sygnał i katalizują tę samą reakcję, mogą wywoływać inne skutki w komórce. Te odmienne odpowiedzi zależą od aktywowanej izoformy PKC, rodzaju komórek, tkanki oraz modelu niedokrwienia mózgu (Bright i Mochly-Rosen 2005, Kowalczyk i wsp. 2012). Dlatego też, kluczowym jest badanie udziału poszczególnych izoform PKC w przebiegu ischemii i reperfuzji.

W związku z tym, że mitochondria są zaangażowane w poischemiczne procesy mogące prowadzić do śmierci lub przeżycia komórek, szczególnie interesująca wydaje się translokacja PKC do mitochondriów po epizodzie niedokrwinnym. W zależności od izoformy tego enzymu i jego oddziaływania z białkami mitochondrialnym można spodziewać się odmiennych skutków translokacji PKC. Dowiedziono, że przemieszczające się do mitochondriów PKC ϵ i PKC δ wykazują przeciwstawne działanie w warunkach niedokrwienia serca. PKC ϵ w modelu prekondukcjonowania ischemicznego serca przemieszcza się do mitochondriów, gdzie katalizuje fosforylację, a przez to aktywuje dehydrogenazę aldehydową 2 (ALDH2). ALDH2 usuwa szkodliwe dla komórek aldehydy i produkty peroksydacji lipidów, co ma efekt protekcyjny w stosunku do mitochondriów (Chen i wsp. 2008). Do postulowanych ochronnych mechanizmów działania PKC ϵ należą również: oddziaływanie z kanałem potasowym mitoK_{ATP} (Raval i wsp. 2003), zapobieganie otwierania MPTP (Baines i wsp. 2003) i zwiększenie aktywności podjednostki IV oksydazy cytochromu c (Ogbi i Johnson 2006). Natomiast PKC δ na skutek I/R serca również jest importowana do mitochondriów, ale jej działanie powoduje zatrzymanie regeneracji puli ATP, nadmierne wytwarzanie reaktywnych form tlenu i nagromadzenie się aldehydów, co może prowadzić zarówno do nekrozy, jak i do apoptozy komórek (Murriel

¹ Badania dotyczyły aktywności PKC podczas ischemii, nie po reperfuzji.

i Mochly-Rosen 2003). W czasie reperfuzji mózgu, podobnie jak w sercu, PKC δ jest kinazą promującą apoptotyczną śmierć komórek (Bright i wsp. 2004, Kowalczyk i wsp. 2012).

Jedną z izoform, której działanie wydaje się być związane z neuroprotekcją po epizodzie niedokrwinnym jest PKC β . W procesie alternatywnego składania transkryptu dochodzi do utworzenia dwóch izoform tego enzymu - PKC β I i β II. Różnią się one między sobą długością łańcucha peptydowego oraz składem aminokwasowym na końcu karboksylowym (Ryc. 5) (Kubo i wsp. 1987). Istnieje szereg doniesień na temat kinazy białkowej C β w warunkach I/R (Zabłocka i wsp. 2001, Niu i wsp. 2005, Bu i wsp. 2011, Kowalczyk i wsp. 2009 i 2012). Poziom PKC β zwiększa się w zagęszczeniach postsynaptycznych neuronów w regionie CA1 hipokampa 24 godziny po 5-minutowym całkowitym niedokrwieniu mózgu myszokoczka, co może być związane z modyfikacją i przekazywaniem sygnału innym komórkom nerwowym (Zabłocka i wsp. 2001).



Ryc. 5 Porównanie sekwencji aminokwasowej PKC β I i PKC β II. W części (A) zaznaczone są cztery zachowane ewolucyjnie domeny (C1-4) oraz regiony zmienne (V1-5). (B) Skład aminokwasowy sekwencji różnicującej izoformy β na końcach karboksylowych (pozycje wskazanych aminokwasów w łańcuchu peptydowym: 622-671). Podkreśleniem zaznaczone są identyczne aminokwasy. Na podstawie: Blobe i wsp. 1996.

W wyniku prekondukcjonowania ischemicznego mózgu myszy obserwuje się wzmożoną translokację/aktywację PKC β II i γ z cytoplazmy do frakcji błonowej (bez zmian ekspresji genów tych białek) zarówno w korze jak i hipokampie (Niu i wsp. 2005). Zaś w badaniach Bu i wsp. (2011) obserwowano przemieszczanie się PKC β II do błon zarówno w ognisku udaru,

jak i penumbrze u myszy, które poddano najpierw prekondycjonowaniu ischemicznemu mózgu, a następnie ogniskowemu niedokrwieniu mózgu. Krótkotrwałe niedokrwienie mózgu myszoskoczka powoduje zwiększenie immunoreaktywności PKC β , γ i δ w mitochondriach wyizolowanych z hipokampa (Kowalczyk i wsp. 2009). Zmiany te są dwufazowe. Pierwsze wzmocnienie immunoreaktywności występuje w krótkim czasie po przywróceniu krążenia i trwa od 0,5 do 3 godz. i może być związane z rozprzestrzenianiem sygnału niedokrwiennego, a drugie w późnym czasie od 72 do 96 godz. i w zależności od izoformy może oznaczać udział danej kinazy w śmierci komórek lub ich przeżyciu (Kowalczyk i wsp. 2009). Mitochondria izolowane z regionów hipokampa o różnej wrażliwości na niedokrwienie mają inną zawartość PKC β . Wzmocniona immunoreaktywność PKC β w różnym czasie po reperfuzji (0,5; 1 i 96 godz.) występuje w mitochondriach części hipokampa mniej wrażliwej na niedokrwienie – CA2-4, DG. PKC β I wskutek poischemicznego przemieszczenia się do mitochondriów może oddziaływać z białkami tworzącymi megakanal mitochondrialny czy łańcuch transportu elektronów (Kowalczyk i wsp. 2012). Zastosowanie inhibitorów PKC β II znosi tolerancję na niedokrwienie powstałą w wyniku prekondycjonowania, powoduje zwiększenie obszaru uszkodzenia mózgu w porównaniu do uszkodzenia obserwowanego u osobników poddanych wcześniej prekondycjonowaniu oraz zwiększa liczbę komórek apoptotycznych (Bu i wsp. 2011). W modelu OGD selektywne zahamowanie aktywności PKC β I powoduje zwiększenie uszkodzenia astrocytów (Wang i wsp. 2004). Zahamowanie PKC β jest przyczyną wzmocnienia uszkodzenia wywołanego przez NMDA w modelu ekscytotoksyczności w skrawkach hipokampalnych szczura (Kowalczyk i wsp. 2012). Aktywacja PKC β przy użyciu estru forbolu (DOPPA) blokuje uruchomienie ścieżki sygnałowej związanej z jądrem komórkowym, co powoduje złagodzenie uszkodzenia wywołanego przez OGD w hodowli neuronów korowych oraz zmniejszenie obszaru zawału w modelu udaru mózgu u myszy (Yang i wsp. 2016). Powyższe przesłanki sugerują zaangażowanie PKC β w rozprzestrzenianie sygnału niedokrwiennego oraz w endogenne procesy ochronne komórek.

6. Hipoteza badawcza i cele pracy

Liczne procesy biochemiczne uruchamiane w odpowiedzi na stres ischemiczno-reperfuzyjny mogą prowadzić do śmierci komórek lub aktywować mechanizmy odpowiedzialne za ich przeżycie. Jednym z nich jest zmiana aktywności kinaz białkowych C obserwowana już w krótkim okresie po przywróceniu krążenia, przejawiająca się translokacją tych enzymów z cytoplazmy do innych przedziałów komórki, m. in. do mitochondriów (Budasz i wsp. 2010, Zheng i wsp. 2011, Sun i wsp. 2013). Dane literaturowe wskazują, że PKC translokowane do mitochondriów biorą udział w regulacji funkcjonowania mitochondriów (Raval i wsp. 2003, Murriel i Mochly-Rosen 2003, Nowak i Bakajsova 2012), co może mieć bezpośrednie przełożenie na los komórek po epizodzie I/R. Badania innych i nasze sugerują udział PKC β w endogennych procesach ochronnych w przebiegu ischemii i reperfuzji (Bu i wsp. 2011, Kowalczyk i wsp. 2012). W związku z tym postawiono hipotezę, mówiącą o tym, że na skutek sygnału ischemiczno-reperfuzyjnego PKC β (1) przedostaje się do mitochondriów w regionie CA2-4, DG hipokampa (2) gdzie pozostaje aktywna lub zostaje aktywowana i (3) oddziałując z różnymi białkami mitochondrialnymi modyfikuje ich działanie, (4) zwiększając w efekcie przeżywalność neuronów. Stąd, głównym celem tej pracy było zweryfikowanie hipotezy o udziale PKC β w endogennej neuroprotekcji po krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu myszokoczka mongolskiego oraz poznanie mechanizmu działania tej kinazy w mitochondriach.

Cele szczegółowe obejmowały zbadanie:

- immunoreaktywności PKC β po I/R w mitochondriach wyizolowanych z regionów hipokampa o różnej wrażliwości na epizod ischemiczno-reperfuzyjny;
- udziału każdej z izoform PKC β (β I i β II) w obserwowanej immunoreaktywności po I/R;
- hipotezy o poischemicznej translokacji PKC β II z cytoplazmy do mitochondriów;
- skutków zahamowania translokacji PKC β II z cytoplazmy do mitochondriów;
- aktywności enzymatycznej PKC β II zlokalizowanej w mitochondriach po I/R;
- potencjalnych oddziaływań PKC β II z białkami mitochondrialnymi;
- skutków biologicznych oddziaływań PKC β II z białkami mitochondrialnymi (wpływ PKC β II na aktywność enzymów);
- mitochondrialnych metabolomów obu części hipokampa: podatnej na uszkodzenie – CA1 i niewrażliwej – CA2-4, DG w próbach kontrolnych i po I/R;
- potencjalnych ilościowych i/lub jakościowych zmian metabolitów mitochondrialnych po zahamowaniu poischemicznej translokacji PKC β II do mitochondriów.

7. Materiały i metody

7.1 Odczynniki i roztwory

Tabela 1 Odczynniki i materiały stosowane w doświadczeniach

Produkt	Producent	Nr kat.
10x Tris/Glycine/SDS	Bio-Rad	1610772
Akrylamid	Sigma	A3553
ATP	Cell Signalling Technology	9804
ATP synthase Specific Activity Microplate Assay Kit	Abcam	ab109716
B-27 Serum Free Supplement (50X)	GIBCO	17504-044
Bisakrylamid	Sigma	M7279
Wkłady do hodowli <i>in vitro</i> : Millicell Cell Culture Insert, 30 mm, hydrophilic PTFE, 0.4 µm	Millipore	PICM03050
CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow	SIGMA	C5338
Czytnik płytek	Tecan	M1000 pro
DTT	Sigma	D5545
Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit	Life Technologies	14321D
Dynabeads Protein G, Novex,	Life Technologies	10007D
ECL- Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare	RPN2106
EDTA	Sigma	E-5134
EGTA	AppliChem	A0878
Ficoll	Sigma	F9378
Etanolamina	Sigma	E95058
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) bez Mg ²⁺ i Ca ²⁺	GIBCO	14175-053
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	GIBCO	24020-091
Histon H1	Millipore	14-155
In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche	11684795910
Inhibitor PKCβ- 3-(1-(3-Imidazol-1-ylpropylo)-1H-indol-3-ilo)-4-anilino-1H-piolo-2,5-dion	Calbiochem	539654
Inhibitory fosfataz	Sigma	P5726
Inhibitory proteaz	Sigma	P8340
Jodek propidyny	Sigma	P4170-25MG
Klisza	GE Healthcare	28906836
Kwas borowy	Sigma	B6768
Kwas N-metylo-D-asparaginowy (NMDA)	Sigma	M3262
MgCl ₂	Sigma	M8266
Nadsiarczan amonu (APS)	Sigma	A3678
Neurobasal A	GIBCO	10888-022
Nitroceluloza - Amersham Protran Supported 0,45 µm	GE Healthcare	10600016
NP-40	Thermo Scientific	85124
Paraformaldehyd	Sigma	P6148
Pierce Modified Lowry Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23240
Fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF)	Sigma	P7626
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad	1610374
Proteinaza K	Sigma	P4850
Pyruvate dehydrogenase (PDH) Combo (Activity + Profiling) Microplate Assay Kit	Abcam	ab110671
Rekombinowana PKCβII	Sigma	P3287

Produkt	Producent	Nr kat.
Laurylosiarczan sodu (SDS)	Sigma	L4390
Surowica końska (HS)	GIBCO	26050-088
TEMED	Sigma	T2024
Tetraboran sodu	Sigma	B3545
Triton X100	Sigma	T8787
Trizma	Sigma	93352
Tween 20	Bio-Rad	1610781
Bufor do badania aktywności kinaz	Cell Signalling Technology	9802

Tabela 2 Składy używanych roztworów i pożywek

Nazwa	Skład
12% roztwór ficoll do izolacji mitochondriów	10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 0,32 M sacharoza
Bufor boranowy do chromatografii pull-down	50 mM tetraboranu sodu, 200 mM kwasu borowego (pH 8,2)
Bufor do elektroforezy SDS-PAGE	Biorad TGS 10x (nr kat. 161-0772)
Bufor do elektrotransferu białek z żelu na błonę nitrocelulozową	25 mM Tris (pH 8,3), 192 mM glicyna, 20% metanol, 0,01% SDS
Bufor do płukania błon w western blot (TBST)	50 mM Tris (pH 7,5), 154 mM NaCl, 0,05% Tween 20
Bufor izotoniczny do frakcjonowania komórek	15 mM Tris/HCl (pH 7,6), 0,25 M sacharoza, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 1 mM PMSF
Bufor octanowy do chromatografii pull-down	1% kwas octowy, 80 mM octanu sodu (pH 3-4)
Pożywka bez surowicy do hodowli skrawków hipokampa	50% Neurobasal, 50% HBSS, 1 M HEPES, glukoza 5 mg/ml, 1% B27, 1% mieszanina amfoterycyny B, penicyliny i streptomycyny
Pożywka z surowicą do hodowli skrawków hipokampa	50% Neurobasal, 22% HBSS, 25% surowica końska, 1M HEPES, glukoza 5 mg/ml, 1% mieszanina amfoterycyny B, penicyliny i streptomycyny
Roztwór do lizy tkanki używany do przygotowania prób do chromatografii pull-down	20 mM Tris (pH 7,5), 1% Triton X100, 1 mM PMSF, 100 μM CaCl ₂ oraz dodawane przed inkubacją mieszaniny inhibitorów fosfataz i proteaz (obie w proporcji 1:200)
Roztwór do lizy tkanki używany do przygotowania prób do testu aktywności PKCβII	20 mM Tris HCl pH 7,5, 1% Triton, 0,5% NP-40, 0,1 mM CaCl ₂ , 1 mM PMSF, koktajl inhibitorów fosfataz i proteaz (Sigma)
Roztwór do reakcji proteinazy K	10 mM Tris (pH 7,4), 1 mM EDTA, 1 mM DTT
Roztwór obciążający próbki w SDS-PAGE (x5)	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% glicerol, 2% SDS, 0,01% błękit bromofenolowy, 1% merkaptioetanolu

7.2 Modele badawcze

W poniższej pracy wykorzystano dwa uznane modele doświadczalne powszechnie używane w badaniach niedokrwienia mózgu: *in vivo* - obustronne, krótkotrwale zaciśnięcie tętnic szyjnych wspólnych myszokoczka mongolskiego i *in vitro* - wywołanie stresu ekscytotoksycznego w hodowli organotypowej skrawków hipokampa szczura. W obu modelach wywołany stres powoduje wybiórczą śmierć komórek nerwowych w regionie CA1 hipokampa, przy jednoczesnym zachowaniu struktury w regionie CA2-4, DG. Zwierzęta używane w badaniach pochodziły ze zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN (IMDiK PAN). Wszystkie procedury wykonywane na zwierzętach

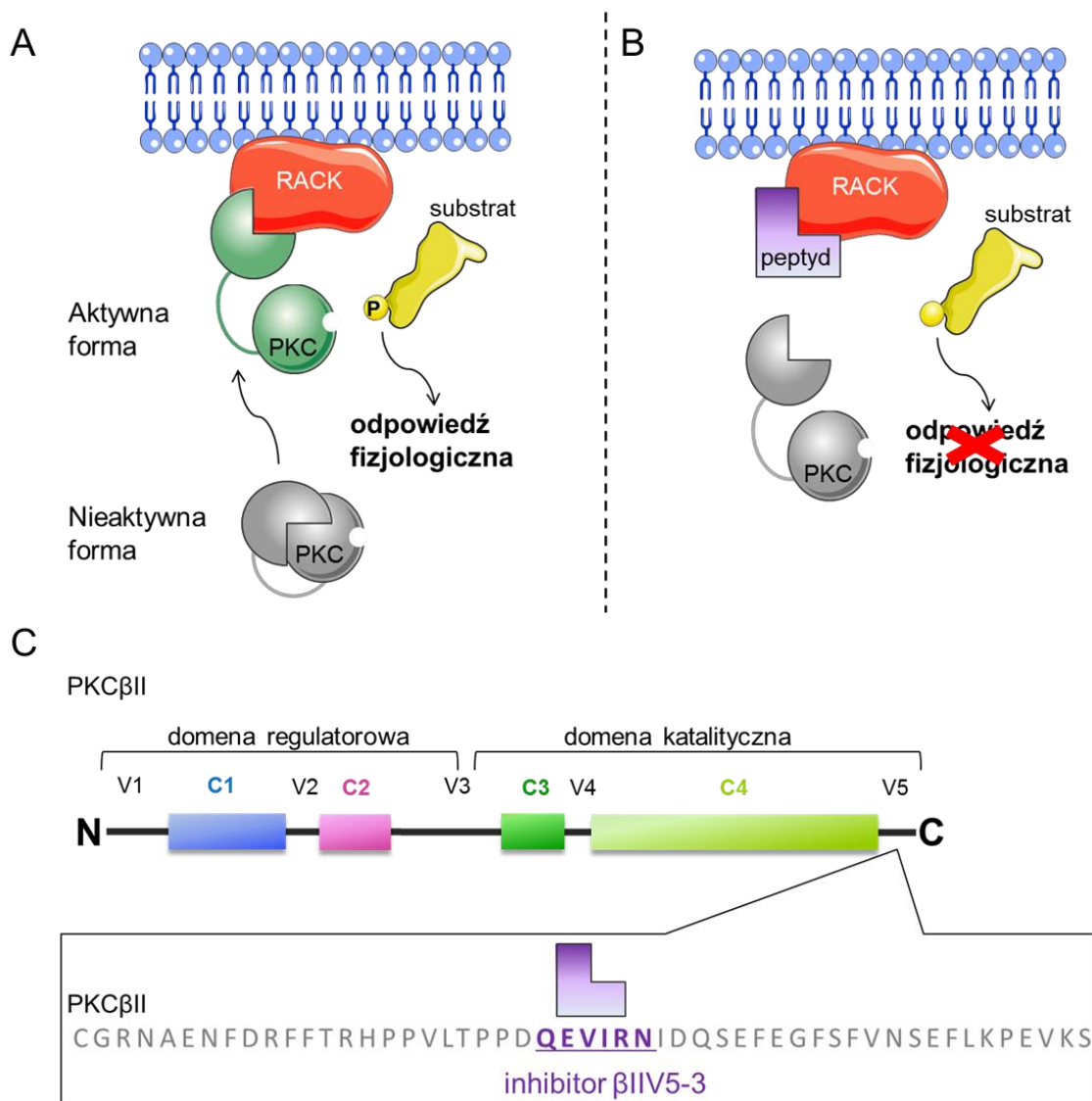
zostały zaakceptowane przez I Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (numery uchwał 39/2012, 63/2015, 379/2017).

7.2.1 Model całkowitego niedokrwienia mózgu myszokoczka mongolskiego

Doświadczenia przeprowadzono na dorosłych, młodych (3-miesięcznych), zdrowych samcach myszokoczka mongolskiego. Zwierzęta były hodowane w kontrolowanych warunkach, w 12-godzinnym cyklu dzień/noc i karmione standardowym pokarmem. Zabieg wykonywano w narkozie wziewnej izofluranowej w kontrolowanych warunkach temperatury (termostatowany blat grzejny, 37°C). Niedokrwienie mózgu było wywoływane poprzez 5-minutowe obustronne zaciśnięcie tętnic szyjnych wspólnych chirurgicznymi klipsami naczyniowymi. Dzięki charakterystycznej budowie anatomicznej unaczynienia mózgu myszokoczka – niepełnemu kołu tętniczemu Willisa, taki zabieg skutkowało całkowitym niedokrwieniem przodomózgowia. Brak dopływu krwi powodował selektywną, opóźnioną śmierć komórek piramidowych części CA1, przy jednoczesnym zachowaniu struktury w regionie CA2-4, DG. Po zakończonym zabiegu niedokrwienia usuwano klipsy naczyniowe i zaszywano powłoki skórne. Operowane zwierzęta powracały do swoich klatek w pokoju eksperymentalnym i przebywały tam aż do czasu pobrania materiału. Zwierzęta poddawano eutanazji w różnym czasie po przywróceniu krążenia: 1, 96 godzin - pozyskiwanie całych hipokampów lub regionów CA1 i CA2-4, DG hipokampa oraz po 7 dniach – izolacja mózgow do badań histologicznych. Zwierzęta niepoddane zabiegowi posłużyły jako kontrole.

W doświadczeniach *in vivo* korzystano ze specyficznego, peptydowego inhibitora PKC β II – β IIV5-3, który uzyskano dzięki uprzejmości profesor Darii Mochly-Rosen (Uniwersytet Stanford, USA). Peptyd ten, o sekwencji QEVIRN (Ryc. 6), odpowiada regionowi (aminokwasy 645-650 sekwencji PKC β II) pośredniczącemu w wiązaniu PKC β II do białka RACK1, o którym mowa we wstępie (strona 27). Inhibitor przenika przez błonę komórkową dzięki połączeniu peptydu QEVIRN z peptydem penetrującym błonę komórkową – TAT. Redukujące warunki panujące wewnątrz komórki powodują zerwanie wiązania dwusiarczkowego łączącego dwa peptydy i uwolnienie inhibitora (Begley i wsp. 2004). Peptyd β IIV5-3 (QEVIRN) łączy się z białkiem RACK1 uniemożliwiając oddziaływanie z PKC β II i tym samym hamując jej aktywność (Stebbins i Mochly-Rosen 2001). W modelu *in vivo* inhibitor β IIV5-3 (rozpuszczony w 0,9% NaCl) podawano jednorazowo do lewej tętnicy szyjnej wspólnej, bezpośrednio przed przywróceniem krążenia nad klipsami naczyniowymi, w dawce 3 mg/kg masy ciała, w objętości

75 μ l. Dawka została wybrana na podstawie danych literaturowych (Ferreira i wsp. 2011a, 2011b, 2012). Zwierzętom poddanym niedokrwieniu mózgu podawano roztwór soli fizjologicznej.



Ryc. 6 Działanie i skład aminokwasowy peptydowego inhibitora PKC β II. (A) Nieaktywna PKC (kolor szary) po otrzymaniu sygnału zmienia swoją konformację, co prowadzi do odsłonięcia miejsca wiązania białka RACK. PKC w formie aktywnej (kolor zielony) może przylegać się do białka RACK, które kotwiczy PKC w pobliżu występowania jej substratów. Fosforylacja substratów przez PKC wywołuje odpowiedź komórki. (B) Peptydowy inhibitor odpowiadający sekwencji PKC oddziałującej z białkiem RACK wiąże się do białka RACK, uniemożliwiając oddziaływanie z PKC i w ten sposób blokując wywołanie odpowiedzi. (C) Inhibitor PKC β II – peptyd β IIV5-3 odpowiada sześciu aminokwasom (QEVIRN) z końca karboksylowej sekwencji aminokwasowej PKC β II. Sekwencja ta odpowiada specyficznemu miejscu oddziaływania PKC β II z RACK1. Na podstawie Palaniyandi i wsp. 2009 oraz Steebins i Mochly-Rosen 2001.

7.2.2 Model ekscytotoksyczności w skrawkach organotypowych hipokampa szczura

Do zakładania hodowli organotypowej skrawków hipokampa wykorzystywano 7-dniowe szczury szczepu Wistar. Skrawki hipokampów pozyskiwano według zmodyfikowanej metody Stoppiniego (1991). Po dekapitacji zwierząt izolowano mózg, a następnie hipokampy, które cięto w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 400 μm za pomocą urządzenia Tissue Chopper (McIlwain). Skrawki przenoszono na wkłady z błoną (0,4 μM , Millipore), a te umieszczano w płytkach sześciokątnych wypełnionych odpowiednią pożywką (składy pożywek podano na str. 33). Hodowlę prowadzono w atmosferze 5% CO_2 i 95% powietrza, w 36°C, początkowo w pożywce z surowicą końską, którą z czasem stopniowo wycofywano. W dniu doświadczenia pożywka była pozbawiona surowicy. W ósmym dniu hodowli, po eliminacji uszkodzonych skrawków, w pozostałych wywoływano stres ekscytotoksyczny poprzez dodanie 100 μM kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA) do pożywki hodowlanej. Po trzech godzinach inkubacji pożywkę wymieniano (bez dodatku NMDA). Po 24 godzinach martwe komórki w skrawkach barwiono jodkiem propidyny (6 μM) i obrazowano w mikroskopie konfokalnym (System Zeiss LSM 510 w Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych IMDiK PAN) przy długości fali wiązki lasera równej 546 nm. Uzyskane zdjęcia cyfrowe analizowano za pomocą niekomercyjnego programu komputerowego umożliwiającego pomiar intensywności fluorescencji jodku propidyny będącej miarą rozległości uszkodzenia hipokampa. Wartości intensywności fluorescencji (FI) poszczególnych skrawków były normalizowane względem maksymalnej intensywności fluorescencji (max FI) otrzymanej przy podaniu 500 μM NMDA.













$$\% \text{ fluorescencji jodku propidyny (FI)} = (\text{FI skrawka} / \text{max FI}) \times 100\%$$

7.3 Frakcjonowanie tkanki

Do doświadczeń używano frakcji: błonowej wzbogaconej w mitochondria (P2) i cytosolowej (S2) lub oczyszczonych mitochondriów (MT) wyizolowanych od myszokoczków kontrolnych i/lub poddanych 5-minutowej ischemii oraz reperfuzji (1-lub 96-godzinnej). Całe hipokampy lub części CA1 oraz CA2-4, DG homogenizowano na lodzie w ręcznym homogenizatorze szkło-teflon (Wheaton) w zimnym buforze izotonicznym, a następnie poddawano je serii wirowań. Homogenat wirowano 1000 x g (10 min, 4°C) eliminując osad zawierający niehomogenizowane fragmenty tkanki oraz jądra komórkowe, a otrzymany supernatant ponownie wirowano 11000 x g (20 min, 4°C). W ten sposób rozdzielono nadsącz

stanowiący frakcję S2 i osad – frakcję P2. W celu uzyskania czystej frakcji mitochondriów frakcję P2 zawieszano w 250 μ l buforu izotonicznego i nanoszono na 1 ml zimnego 12% roztworu ficoll. Tak przygotowaną próbkę wirowano 100000 x g, 30 min, 4°C. Supernatant usuwano, a osad mitochondriów delikatnie przemywano 100 μ l buforu izotonicznego, a następnie zawieszano go w 60 μ l buforu izotonicznego i zamrażano w -80°C. Stężenie białka w poszczególnych frakcjach mierzono metodą Lowry’ego (Modified Lowry Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Czystość frakcji mitochondrialnej potwierdzono metodą western blot (Tabela 3), wykluczając obecność białek charakterystycznych dla innych przedziałów komórki tj.: kadheryna (błona komórkowa), dehydrogenaza mleczanowa (cytosol), receptor trifosfoinozytoly (siateczka śródplazmatyczna) oraz wykazując wzmocnienie typowych markerów mitochondrialnych tj. kanał anionowy zależny od napięcia i oksydaza cytochromowa (mitochondria).

Tabela 3 Wyniki analizy czystości frakcji mitochondrialnej. Immunodetekcja wybranych białek we frakcjach błonowej (P2), cytosolowej (S2) i mitochondrialnej (MT).

Białko	Przedział komórkowy	Frakcja P2	Frakcja S2	Frakcja MT
Kanał anionowy zależny od napięcia (VDAC)	Zewnętrzna błona mitochondrialna			
Oksydaza cytochromowa (COXIV)	Wewnętrzna błona mitochondrialna			
Kadheryna	Błona komórkowa			
Receptor trifosfoinozytoly (IP ₃ R)	Siateczka śródplazmatyczna			
β -aktyna	Cytoszkielec			
Dehydrogenaza mleczanowa (LDH)	Cytoplazma			

7.4 Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) i elektrotransfer

Próbki białkowe (20-25 μ g) łączono z roztworem obciążającym do próbek (5 x stężonym), dokładnie mieszano a następnie denaturowano poprzez gotowanie w 100°C przez 5

minut. Tak przygotowane mieszaniny rozdzielano w 10% żelach poliakrylamidowych przez ok. 1 godzinę przy napięciu 80-180 V. Do oszacowania masy rozdzielanych białek używano komercyjnego roztworu białek – standardów Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad).

Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym, białka przenoszono na błonę nitrocelulozową Amersham Protran Supported 0,45 μm (GE Healthcare). Elektrotransfer prowadzono w buforze do transferu (Tabela 2, strona 33) w warunkach obniżonej temperatury, przez 90 minut przy stałym natężeniu prądu 350 mA.

7.5 Western blot

Po zakończonym elektrotransferze błonę nitrocelulozową płukano 3 razy po 5 minut w TBST (str. 33, Tabela 2). Następnie błonę blokowano w 5% roztworze odtuszczonego mleka w TBST (1 godz., RT). Po zablokowaniu niespecyficznego miejsca wiązania, nadmiar mieszaniny blokującej odpłukiwano 3 razy po 5 minut buforem TBST. Tak przygotowaną nitrocelulozę inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem. W zależności od rodzaju przeciwciała inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej przez 1,5 lub 2 godziny albo w 4°C przez 12 godzin (Tabela 4). Po inkubacji i trzykrotnym przepłukaniu TBST, błonę inkubowano przez 30 minut z drugorzędowym przeciwciałem sprzężonym z peroksydazą chrzanową. Reakcje chemiluminescencji wywoływano używając substratu dla peroksydazy ECL (GE Healthcare) oraz obrazowano za pomocą aparatu Fusion Fx6 (Vilber Lourmat) lub na kliszy fotograficznej.

Tabela 4 Lista przeciwciał używanych w doświadczeniach

Przeciwciało	Producent	Masa antygenu (kDa)	Warunki inkubacji
PKC β	BD Transduction Laboratories 610128	80	1° 1:200 w TBST, 1,5 h RT 2° 1:4000 w 5% mleku, 30 min, RT
PKC β I	Abcam ab4132	80	1° 1:250 w 2% mleku, o/n, 4°C 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT
PKC β II	Abcam ab32026	80	1° 1:250 w 2% mleku, o/n, 4°C 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT
PKC β II	Santa Cruz Biotechnology sc210	80	1° 1:100 w TBST, 2 h, RT 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT
Oksydaza cytochromowa (COXIV)	Invitrogen 459600	19,6	1° 1:1000 w TBST, 1,5 h; RT 2° 1:4000 w 5% mleku, 30 min, RT
Dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa (GAPDH)	Chemicon International MAB374	36	1° 1:1000 w TBST, 2 h, RT 2° 1:4000 w 5% mleku, 30 min, RT
Translokaza błony wewnętrznej mitochondriów 23 (TIM23)	Proteintech 11123-1-AP	22	1° 1:200 w TBST, 2 h, RT 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT
Mitochondrialna proteaza serynowa (OMI)	Proteintech 15775-1-AP	36	1° 1:1000 w TBST, 2 h, RT 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT
Karboksylaza pirogronianowa	Proteintech 16588-1-AP	125	1° 1:500 w TBST, 2 h, RT 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT

Przeciwciało	Producent	Masa antygeny (kDa)	Warunki inkubacji
Ufosforylowany histon H1	Upstate 06-597	32	1° 1:500 w 2% BSA 2 h, RT 2° 1:8000 w 2% BSA 30 min, RT
Histon H1	Abcam ab154111	20	1° 1:1000 w TBST, 2 h, RT 2° 1:8000 w 5% mleku, 30 min, RT
Syntaza ATP, podjednostka α	Abcam ab14748	53	1° 1:1000 w TBST, 2 h, RT 2° 1:4000 w 5% mleku, 30 min, RT
Syntaza ATP, podjednostka β	Abcam ab14730	55	1° 1:200 w TBST, 2 h, RT 2° 1:4000 w 5% mleku, 30 min, RT
Dehydrogenaza pirogronianowa, domena E1, podjednostka β	Abcam ab110331	39	1° 1:1000 w TBST, 2 h, RT 2° 1:4000 w 5% mleku, 30 min, RT
Białko p32 (c1qbp)	Proteintech 24474-1-AP	32	1° 1:500 w TBST, 2 h, RT 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT
Dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa (mitochondrialna)	Proteintech 17219-1-AP	68	1° 1:500 w TBST, 2 h, RT 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT
Oksydoreduktaza NADH-ubichinon, podjednostka 75 kDa	Proteintech 12444-1-AP	75	1° 1:200 w TBST, 2 h, RT 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT
Transporter 2-oksoglutaran/jabłczan	Proteintech 12253-1-AP	30-34	1° 1:200 w TBST, 2 h, RT 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT
Reduktaza ubichinol-cytochrom c, białko Rieskiego 1 typu żelazo-siarka	Proteintech 18443-1-AP	25	1° 1:500 w TBST, 2 h, RT 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT
Glutaminaza typu nerkowego	Proteintech 12855-1-AP	58-65	1° 1:200 w TBST, 2 h, RT 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT
Kanal anionowy zależny od napięcia (VDAC)	Santa Cruz Biotechnology sc390996	36	1° 1:500 w TBST, 1,5 h, RT 2° 1:4 000 w 5% mleku 30 min, RT
Kadheryna	Abcam ab6529	142	1° 1:200 - TBST, o/n, 4°C 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT
Receptor trifosfoinozytolowy (IP ₃ R)	AffinityBioreagents PA1-901	240	1° 1:1 000 - TBST, o/n, 4°C 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT
β -aktyna	Sigma A2066	42	1° 1:1 000 w 5% mleku, 2 h, RT 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT
Dehydrogenaza mleczanowa (LDH)	Proteintech 14824-1-AP	35	1° 1:1 000/TBST, 2 h, RT 2° 1:8000 w 5% mleku 30 min, RT

1° przeciwciało pierwszorzędowe

2° przeciwciało drugorzędowe sprzężone z peroksydazą chrzanową

7.6 Peptyd β IIV5-3 jako narzędzie badawcze – badanie translokacji PKC β II do mitochondriów

W celu wykazania, że obserwowany wzrost immunoreaktywności PKC β II w mitochondriach jest wynikiem jej translokacji z cytoplazmy wykonano następujące doświadczenia: obrazowanie zmian lokalizacji PKC β II za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz badanie immunoreaktywności PKC β II we frakcji błonowej - P2 i cytosolowej – S2 oraz czystych mitochondriach. Do doświadczeń wykorzystano następujące grupy zwierząt - kontrolną, ischemiczną – poddaną 5-minutowej ischemii i 1-godzinnej reperfuzji (I/R 1h + NaCl) oraz ischemiczną, której podawano inhibitor PKC β II (I/R 1h + β IIV5-3).

7.6.1 Transmisyjna mikroskopia elektronowa

Obserwacje prowadzono przy użyciu mikroskopu elektronowego JEM 1011 w Środowiskowym Laboratorium Mikroskopii Elektronowej IMDiK PAN. Zwierzęta z trzech grup badanych perfundowano 4% roztworem paraformaldehydu w PBS (pH 7,4). Wyizolowane hipokampy dzielono na regiony CA1 i CA2-4, DG, a następnie utrwalano przez noc w ww. roztworze. Skrawki inkubowano z 1% OsO₄ przez godzinę, odwadniano w gradiencie etanolu (30-100%) i zatapiano z użyciem Agar 100 resin kit R1031 (Agar Scientific Ltd.). Skrawki cięto używając ultramikrotomu (LKB-NOVA) i przenoszono na niklowe siatki pokryte formvarem, po czym inkubowano je 10 minut w 10% H₂O₂. Po inkubacji skrawki płukano PBS i inkubowano w buforze blokującym – 0,1% BSA, a następnie z przeciwciałem anti-PKCβII (Santa Cruz Biotechnology, 1:30 w PBS) przez noc w 4°C. Do detekcji użyto drugorzędowego przeciwciała anti-mysz skoniugowanego z 12 nm cząsteczkami złota (Jackson ImmunoResearch, 1:50). Równolegle specyficzność barwienia weryfikowano, inkubując skrawki według metody opisanej powyżej, ale z pominięciem przeciwciała pierwszorzędowego.

7.6.2 Badanie zmian immunoreaktywności PKCβII we frakcjach S2 i P2 oraz oczyszczonych mitochondriach

Fracje: mitochondrialna oraz S2 i P2 posłużyły do zbadania zmian immunoreaktywności PKCβII techniką western blot z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających PKCβII (Abcam) oraz GAPDH (Chemicon) i COXIV (Invitrogen) jako kontroli ilości białka nałożonego na żel.

7.7 Test dostępności białek dla proteiny K

W celu poznania dokładnej lokalizacji PKCβII po I/R wewnątrz mitochondriów wykonano test, w którym białka charakterystyczne dla danego przedziału komórkowego poddaje się trawieniu różnym stężeniem proteiny K. W zależności od lokalizacji białka – jego dostępności dla proteazy - uzyskuje się różny stopień strawienia danego białka, co obrazowane jest różnicą w intensywności prążków w analizie western blot. Procedurę testu dostępności białek dla proteiny K opracowano w oparciu o prace Guo i wsp. (2004) oraz Vijayvergiya i wsp. (2005). Mitochondria (25 µg białka) wyizolowane z hipokampów myszokoczek poddanych 5-minutowej ischemii i jednogodzinnej reperfuzji inkubowano (20 min, 37°C) w buforze do trawienia w obecności różnych stężeń proteiny K (0, 5, 25, 50, 100, 500, 1000, 2500 µg/ml). Reakcję trawienia zatrzymywano 0,2 M PMSF i 10-minutową inkubacją próbek w lodzie. Następnie próby wirowano (12000 x g, 15 min, 4°C), otrzymany osad zawieszano w 20 µl buforu

do trawienia (bez proteiny K) i roztworze obciążającym do próbek. Tak przygotowane próbki denaturowano w 100°C przez 10 minut. Po ostudzeniu próbki rozdzielano w 10% żelu SDS-PAGE i poddawano transferowi na błonę nitrocelulozową jak opisano wcześniej (str. 37-38). Metodą western blot prowadzono immunodetekcję białek mitochondrialnych z różnych przedziałów: Omi (przestrzeń międzybłonowa), Tim23 (wewnętrzna błona mitochondriów), karboksylaza pirogronianowa (macierz) oraz PKC β II.

7.8 Detekcja sekwencji kierującej do mitochondriów - MitoFates

Większość białek przeznaczonych do mitochondrialnego importu posiada tzw. sekwencje kierującą. Zazwyczaj jest to odcinek białka (10-80 reszt aminokwasowych) na jego aminowym końcu charakteryzujący się hydrofilowością, ładunkiem dodatnim i zdolnością do tworzenia amfipatycznej struktury helisy. Sekwencja kierująca jest odcinana po dotarciu do miejsca przeznaczenia (Michejda 1997, Neupert i Herrmann 2007). Celem sprawdzenia czy PKC β II posiada taką sekwencję, wykorzystano internetowy program bioinformatyczny MitoFates (<http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi>). Oprogramowanie to służy do przewidywania obecności sekwencji kierującej w białkach na podstawie składu aminokwasowego, właściwości fizyko-chemicznych oraz obecności miejsc odcięcia sekwencji (Fukasawa i wsp. 2015). Jako kontrola posłużyła oksydaza cytochromu c, o której wiadomo, że jest importowana do wnętrza mitochondriów i posiada sekwencję kierującą do mitochondriów. Do analizy użyto sekwencji PKC β II i oksydazy dla białek szczura w formacie FASTA pochodzących z bazy danych Uniprot, dostępnych pod numerami odpowiednio P68403-2 i P10888.

7.9 Test *in vitro* aktywności enzymatycznej PKC β II w mitochondriach

Czyste frakcje mitochondrialne (100 μ g białka) otrzymane z regionu CA2-4, DG hipokampa myszokoczków kontrolnych lub poddanych ischemii (5 min) i reperfuzji (I/R 1h i I/R 96h) inkubowano w buforze do lizy (30 min w 4°C), a następnie wirowano (12000 x g, 15 min, 4°C). Otrzymane supernatanty inkubowano (2 godz., RT) ze złożem kulek magnetycznych opłaszczonych wcześniej przeciwciałem anty-PKC β II (Abcam) w celu wyizolowania endogennej PKC β II z mitochondriów. Po przepłukaniu złoża inkubowano je z 200 μ M ATP i 0,1 mg/ml histonu H1 (30 min, 37°C) w buforze do pomiaru aktywności kinaz (Cell Signalling Technology). Następnie mieszaninę reakcyjną z nad złoża przenoszono do nowej próbki i gotowano 5 min w 100°C w 5x stężonym roztworze do obciążenia próbek. Otrzymane próby były rozdzielane metodą SDS-PAGE i analizowane z użyciem przeciwciał rozpoznających ufosforylowany i nieufosforylowany histon H1.

7.10 Badanie wpływu inhibitorów PKC β II na śmiertelność komórek

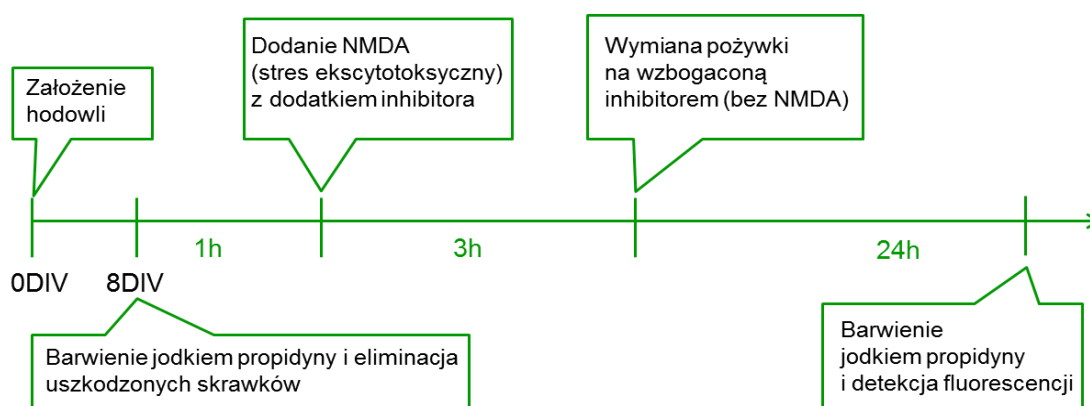
W celu weryfikacji czy aktywność PKC β II ma związek z neuroprotekcją sprawdzono skutki zahamowania tej kinazy w obu modelach doświadczalnych.

7.10.1 Doświadczenie z użyciem inhibitorów PKC β II w skrawkach organotypowych hipokampa szczura poddanych ekscytotoksyczności

Badania *in vitro* polegały na wywołaniu stresu ekscytotoksycznego w hodowli skrawków hipokampa szczura (p. str. 36) z jednoczesnym podaniem wybranego inhibitora PKC β II i wizualizacji uszkodzonych komórek w skrawkach za pomocą fluorescencyjnego znakowania jodkiem propidyny.

Do pierwszego doświadczenia użyto komercyjnie dostępnego inhibitora PKC β : 3-(1-(3-Imidazol-1-ylpropylo)-1H-indol-3-ilo)-4-anilino-1H-pirol-2,5-dionu (Calbiochem, nr CAS: 257879-35-9) opracowanego przez Tanakę i wsp. (2004). Związek ten działa jako inhibitor współzawodniczący z ATP o miejsce aktywne enzymu i charakteryzuje się selektywnością wobec PKC β II ponad 60-krotnie wyższą niż wobec PKC α czy ϵ . Eksperymentalnie ustalono, że w stężeniu 5 nM hamuje ona 50% aktywności biologicznej PKC β II (IC₅₀ = 5 nM) (Tanaka 2004). 5 nM inhibitor wraz z 100 μ M NMDA dodawano do pożywki skrawków hipokampa w 8 dniu prowadzenia hodowli (Ryc. 7). Dodatkowo, sprawdzono toksyczność rozpuszczalnika inhibitora – 0,1% DMSO oraz 5 nM inhibitora podanego bez NMDA.

W drugim doświadczeniu użyto wspomnianego wcześniej (str. 34-35) peptydowego inhibitora β IIV5-3 w stężeniach 0,5; 1; 2 μ M, który podawano do pożywki wraz z czynnikiem uszkadzającym - 100 μ M NMDA w ósmym dniu hodowli.



Ryc. 7 Przebieg doświadczenia w modelu uszkodzenia ekscytotoksycznego organotypowych skrawków hipokampa. DIV- dzień *in vitro*

W obu doświadczeniach, po wybarwieniu jodkiem propidyny, skrawki obrazowano w mikroskopie konfokalnym po upływie 24 godzin od podania NMDA z inhibitorem, tak jak to opisano wcześniej (p. str. 36).

7.10.2 Wizualizacja skutków podania inhibitora PKC β II po ischemii i reperfuzji mózgu myszosczka

Zwierzęta kontrolne, poddane 5-minutowej ischemii i 7-dniowej reperfuzji (I/R oraz takie, którym dodatkowo podano inhibitor β IIV5-3 bezpośrednio po niedokrwieniu (I/R + β IIV5-3) poddano perfuzji 4% paraformaldehydem. Całe mózgi izolowano, zatapiono w parafinie, cięto w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 10 μ m, a następnie wykonywano barwienia odpowiednimi technikami.

7.10.2.1 Barwienie H/E

Standardowe barwienie hematoksyliną i eozyną (H/E) posłużyło do oceny struktury tkanki hipokampa po ischemii i reperfuzji oraz po zastosowaniu inhibitora. W celu oceny uszkodzenia komórek hipokampa w skrawkach barwionych H/E liczono prawidłowe morfologicznie neurony w trzech obszarach regionu CA1, każdy o długości 200 μ m.

7.10.2.2 Barwienie TUNEL

Technika znakowania fragmentów DNA za pomocą dUTP przy udziale terminalnej transferazy - ang. *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated d-UTP Nick End-Labeling* (TUNEL) służy do wykrywania apoptozy. Jest to możliwe dzięki temu, że podczas zaprogramowanej śmierci komórki nić DNA jest fragmentowana na odcinki o stałej długości 180 par zasad z wolnymi końcami 3'-OH. Transferaza dobudowuje znakowane nukleotydy do wolnych końców wodorotlenkowych tym samym umożliwiając detekcję charakterystycznie pofragmentowanego DNA.

Skrawki przygotowano według instrukcji producenta zestawu In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche). W skrócie: skrawki odparafinowano ksylenem i uwodniano w malejącym gradiencie etanolu (100 - 0%). Błony komórek poddano permeabilizacji poprzez inkubację z proteinazą K (20 μ g/ml). Tak przygotowane skrawki inkubowano z mieszaniną reakcyjną zawierającą m.in. enzym - terminalną deoksynukleotydową transferazę (TdT) oraz znacznik - fluoresceinę. Wyznakowane skrawki obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym przy długości fali równej 488 nm. Miarą rozległości uszkodzenia w skrawkach barwionych techniką TUNEL była intensywność fluorescencji. W celu wykluczenia fałszywych sygnałów zastosowano

kontrolę negatywną – skrawki inkubowano w roztworze do znakowania bez TdT. Z kolei jako kontroli pozytywnej użyto skrawki wyizolowane ze zwierząt kontrolnych poddane działaniu DNazy I, a następnie inkubowane z mieszaniną reakcyjną jak opisano wyżej.

7.11 Chromatografia typu pull-down

Przed rozpoczęciem właściwego doświadczenia „aktywowano” złoże - bromocyjan sefarozy (CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow, Sigma) stosując 1 mM HCl wymywający reszty cukrowe zasłaniające wolne końce złoża. Gotowe złoże równoważono buforem boranowym, a następnie delikatnie mieszano z 25 µg rekombinowanej PKCβII (inkubacja nocna, 4°C). W celu usunięcia niezwiązanej PKCβII, sefarozę odwirowano (1000 x g, 5 min, RT) i odciągnięto supernatant. Złoże płukano buforem boranowym i blokowano wolne reszty złoża 1 M etanolaminą (2 x 15 min, RT) i trzykrotnie płukano złoże stosując naprzemiennie bufor octanowy (pH 3-4) i bufor Tris z NaCl (pH 8-9). Następnie złoże zrównoważono buforem do lizy i przenoszono po 1,5 mg do nowych probówek typu eppendorf. Równoległe przygotowano mitochondria, wyizolowane z całych hipokampów kontrolnych (600 µg białka). Frakcje mitochondrialne mieszano z buforem do lizy z dodatkiem inhibitorów fosfataz i proteaz (30 min, 4°C). Ekstrakty białkowe odwirowywano (15000 x g, 30 min, 4°C), a otrzymany nadsącz przenoszono w równych objętościach do probówek ze złożem połączonym z rekombinowaną PKCβII i inkubowano z mieszaniną (300 rpm, inkubacja nocna, 4°C). Kolejnego dnia usuwano nadmiar lizatu (1000 x g, 1 min, 4°C) i wymywano niespecyficznie związane białka trzykrotnie płuczając złoże buforem do lizy. Na koniec złoże zawieszano w buforze do lizy i oddawano do analizy techniką spektrometrii mas (MS) mającej na celu identyfikację kompleksów białkowych związanych z PKCβII. Badanie wykonano w trzech powtórzeniach, jako kontrola posłużyło złoże bez sprzężonej PKCβII.

7.12 Badania proteomiczne

Analiza białek była przeprowadzona przy użyciu chromatografii cieczerwowej sprzężonej ze spektrometrią mas w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN. Białka otrzymane w wyniku chromatografii pull-down były poddane standardowej procedurze trawienia trypsyną stosowanej w laboratorium. Otrzymane, w wyniku trawienia, peptydy poddano analizie typu LC-MS/MS (tandemowa spektrometria mas sprzężona z wysokosprawną chromatografią cieczerową). Posługiwano się chromatografem Acquity nanoUPLC (Waters) połączonym ze spektrometrem mas Orbitrap Elite (Thermo). Otrzymane dane poddano wstępnemu przetwarzaniu w programie Mascot Distiller (wersja 2.4.2.0,

MatrixScience). Następnie, w celu identyfikacji peptydów, otrzymane masy i widma fragmentacyjne były analizowane względem wszystkich referencyjnych sekwencji białek szczura (7937 sekwencji) z bazy danych SwissProt przy użyciu programu Mascot search engine (Mascot Daemon v. 2.4.0, Mascot Server v. 2.4.1, MatrixScience). Statystyczna ocena wiarygodności przypisania peptydów została oparta na metodzie tzw. *target/decoy* (Elias i wsp. 2005). Pozwala ona na oszacowanie q-wartości dla każdego PSM (ang. *peptide spectrum match*, czyli dopasowania sekwencji do widm fragmentacyjnych) w zbiorze wyników. Wszystkie PSM o q-wartościach wyższych niż 0,01 zostały usunięte z dalszej analizy. Jedynie te białka, które zostały zidentyfikowane na podstawie przynajmniej dwóch peptydów zostały uznane za jednoznacznie zidentyfikowane. Kalibrację mas i filtrowanie danych prowadzono w programie utworzonym w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas IBB PAN – Mscan (<http://proteom.ibb.waw.pl/mscan/>).

Z wyników dostarczonych przez Laboratorium do dalszych analiz wybrano te białka, których identyfikacja miała przypisaną wartość score nie niższą niż 50 w próbach zawierających rekombinowaną PKC β II. Im wyższa jest wartość score tym wyższe prawdopodobieństwo, że peptydy zostały poprawnie przypisane do danego białka.

7.13 Koimmunoprecypitacja

Do koimmunoprecypitacji używano zestawu Dynabeads Co-Immunoprecipitation i postępowano według zaleceń producenta (Life Technologies). Złoże zawieszano w odpowiednim buforze z zestawu i inkubowano z przeciwciałem o właściwym stężeniu (w zależności od doświadczenia i użytego przeciwciała wartości wahały się od 1 do 10 μ g) przez noc w 37°C na mieszadle. Po wypłukaniu nadmiaru przeciwciała złoże równoważono buforem do ekstrakcji. Równolegle przygotowano ekstrakt mitochondriów – mitochondria (100 μ g białka) wyizolowane po jednej godzinie reperfuzji z części CA2-4, DG hipokampa inkubowano z buforem do lizy (30 min, 4°C). Mieszaninę odwirowano (12000 x g, 15 min, 4°C), otrzymany supernatant łączono ze złożem poprzez delikatne pipetowanie i inkubowano (1 godz., RT). Następnie złoże płukano trzykrotnie buforem do ekstrakcji, w celu usunięcia niespecyficznie związanych białek. W celu uwolnienia kompleksów białkowych od złoża, dodawano bufor obciążający do próbek, gotowano (5 min, 100°C), rozdzielano supernatant w żelu SDS-PAGE, a później poddawano analizie western blot.

7.14 Pomiary aktywności i ilości enzymów

7.14.1 Dehydrogenaza pirogronianowa

Do doświadczenia użyto trzech grup zwierząt: kontrolnej, poddanej 5-minutowej ischemii i 1- godzinnej reperfuzji (I/R 1h + NaCl) oraz takiej, której dodatkowo bezpośrednio po przywróceniu krążenia podawano inhibitor PKC β II (I/R 1h + β IIV5-3). Wyizolowane hipokampy, dzielono na region CA1 i CA2-4, DG w PBS z dodatkiem NaF (10 mM) i mieszaniny inhibitorów proteaz (1:100). Dodatek inhibitorów miał za zadanie zachować endogenny poziom fosforylacji dehydrogenazy pirogronianowej. Do pomiarów aktywności i względnej ilości dehydrogenazy pirogronianowej użyto prób zawierających odpowiednio 150 i 15 μ g białka. Aktywność dehydrogenazy pirogronianowej mierzono za pomocą zestawu firmy Abcam (Pyruvate dehydrogenase (PDH) Combo (Activity + Profiling) Microplate Assay Kit). Zasada działania testu opiera się na pomiarze przyrostu absorbancji barwnego produktu powstałego w trakcie redukcji NAD $^{+}$ do NADH towarzyszącej reakcji dekarboksylacji pirogronianu do acetylo-CoA i CO $_2$. Pierwszy etap – izolacja enzymu, polegał na związaniu endogennej dehydrogenazy pirogronianowej z badanych prób za pomocą przeciwciała (specyficznego rozpoznającego dehydrogenazę pirogronianową E2/E3bp), którym opłaszczono były dna dołków płytki. Następnie enzym inkubowano w mieszaninie reakcyjnej zawierającej NAD $^{+}$. Absorbancję mierzono w aparacie Tecan (Infinite M1000 pro) przy długości fali równej 450 nm przez 45 minut w 30 sekundowych odstępach. Do obliczeń wybrano zakres wartości, w którym przyrost absorbancji był prostoliniowy. Wartości aktywności zostały wyrażone jako Δ mOD/min. Pomiar względnej ilości białka odbywał się na zasadzie pośredniego testu immunoenzymatycznego (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA). Do płytki z wyizolowanym enzymem dodawano pierwszorzędowe przeciwciało skierowane przeciwko dehydrogenazie pirogronianowej, a następnie drugorzędowe przeciwciało połączone z peroksydazą chrzanową. Wartości absorbancji były rejestrowane przy długości fali równej 600 nm przez 45 minut w 30 sekundowych odstępach. Podobnie jak w przypadku pomiaru aktywności dehydrogenazy pirogronianowej, ilość enzymu została wyrażona jako Δ mOD/min.

7.14.2 Mitochondrialna ATP-aza (syntaza ATP)

Aktywność i względną ilość syntazy ATP mierzono za pomocą zestawu pomiarowego firmy Abcam (ATP synthase Specific Activity Microplate Assay Kit). Do pomiarów użyto czystej frakcji mitochondrialnej (10 μ g białka) wyizolowanej z trzech grup zwierząt: kontrolnej, poddanej ischemii i 1 godzinnej reperfuzji (I/R 1h + NaCl) oraz takiej, której dodatkowo, bezpośrednio

po przywróceniu krążenia, podawano inhibitor PKC β II (I/R 1h + β IIV5-3). Z mitochondriów izolowano syntazę ATP za pomocą przeciwciała (anty-F1) znajdującego się w dołkach płytki i przeprowadzano reakcję enzymatyczną w warunkach zalecanych przez producenta. Aktywność syntazy ATP była mierzona jako prędkość hydrolizy ATP do ADP. Produkcja ADP była sprzężona z utlenieniem NADH do NAD⁺, co było rejestrowane jako zmniejszenie absorbancji w czasie trwania reakcji mierzonej w czytniku płytkowym Tecan (Infinite M1000 pro) przy długości fali równej 340 nm przez 3 godziny co 5 minut. Ilość syntazy ATP była mierzona w tej samej płytce co jej aktywność. Do dołków z wyizolowaną syntazą ATP dodawano przeciwciało rozpoznające badane białko połączone z alkaliczną fosfatazą, która katalizowała przemianę przezroczystego substratu: *o*-nitrofenylofosforanu do żółtego produktu. Absorbancję mierzono przy długości fali równej 405 nm przez jedną godzinę w 1-minutowych odstępach. Do dalszej analizy wybrano zakres wartości, w którym przyrost absorbancji był prostoliniowy. Wartości aktywności jak i ilości syntazy ATP zostały wyrażone jako Δ MOD/min.

7.15 Badania metabolomiczne

Przypuszczając, że poischemiczne oddziaływania PKC β II z białkami mitochondrialnymi mogą wywołać zmiany w składzie metabolitów wewnątrz mitochondriów wykonano niecelowane analizy metabolomiczne. Badania te są innowacyjnym podejściem związanym z uzyskaniem tzw. metabolomicznego odcisku palca (ang. *metabolic fingerprinting*) charakterystycznego dla badanego materiału biologicznego oraz oznaczeniu jakościowym zmian zachodzących pod wpływem danego czynnika np. niedokrwienia. W konsekwencji umożliwia to stworzenie profilu metabolomicznego charakterystycznego dla danej grupy (np. kontrola vs I/R). Badania z zakresu metabolomiki wykonano podczas stażu w Centrum Metabolomiki i Bioanaliz (Centre for Metabolomics and Bioanalysis, CEMBIO) mieszczącym się na Uniwersytecie San Pablo CEU w Madrycie. Przeprowadzone analizy miały charakter pilotażowy, mający na celu optymalizację procesu ekstrakcji metabolitów z badanego materiału biologicznego oraz dobranie optymalnych parametrów metod analitycznych opartych na spektrometrii mas. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów możliwe było wykonanie niecelowanych analiz z wykorzystaniem minimalnej ilości materiału biologicznego (0,6 – 1,3 μ g/ μ l białka). Doświadczenia wykonano na mitochondriach wyizolowanych z obu części hipokampa (CA1 i CA2-4, DG) zwierząt podzielonych na 3 grupy eksperymentalne: kontrolną, poddaną 5-minutowej ischemii (I/R 1h + NaCl) oraz taką, której bezpośrednio po 5-min. niedokrwieniu mózgu podano peptydowy inhibitor PKC β II (IR 1h + β IIV5-3). Każda grupa eksperymentalna składała się z trzech powtórzeń biologicznych.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-Q-MS). Platforma GC-MS została wybrana ze względu na wysoką czułość, powtarzalność i precyzję wykonywanych pomiarów. Ponadto, technika GC-MS pozwala na oznaczenie oraz identyfikację związków należących do różnorodnych grup chemicznych takich jak np.: kwasy karboksylowe, aminy, amidy, estry, alkohole, aldehydy, tłuszcze, cukry, aminokwasy.

7.15.1 Przygotowanie prób

Mitochondria zostały wyizolowane metodą opisaną w Materiałach i Metodach (p. str. 36-37). Po izolacji otrzymany osad mitochondriów mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C . Ze względu na specyfikę doświadczenia oraz ograniczoną ilość materiału biologicznego, procedurę ekstrakcji metabolitów przeprowadzono po zaadoptowaniu standardowego protokołu przygotowania prób do oznaczeń GC-MS używanego w laboratorium CEMBIO (Garcia i Barbas 2011). Zamrożony osad mitochondriów zawieszono w 80 μl ultraczystej wody dejonizowanej (Milli-Q). Lizę mitochondriów przeprowadzono poprzez czterokrotne rozmrażanie (40°C) i zamrażanie (ciekły azot). Następnie do prób dodano 240 μl zimnego (-20°C) acetonitrylu zawierającego wzorec wewnętrzny (0,125 mM chlorofenylalanina) i intensywnie mieszano przez 1 minutę. Próby odwirowano (16000 x g, 10 min, 4°C) a supernatant (ekstrakt) użyto do dalszego przygotowania materiału do analiz GC-MS. Pozostały osad zamrożono w -80°C , a następnie posłużył on do pomiaru stężenia białka w próbach metodą Lowry'ego (p. str. 37). Równoległe przygotowano próbę zerową (tzw. blank) zawierającą 80 μl wody i 240 μl acetonitrylu.

Otrzymane ekstrakty poddano chemicznej modyfikacji tzw. derywatywacji, która ma na celu otrzymanie form o zwiększonej lotności umożliwiającej rozdział w chromatografii gazowej. Pierwszy etap polegał na przeprowadzeniu reakcji metoksymacji w celu ochrony grup funkcyjnych zawierających aktywne wodory. Grupy funkcyjne takie jak -SH (tiole), -OH (alkohole, fenole, enole, poliole), -NH (aminy, amidy) oraz -COOH (kwasy karboksylowe) wykazują tendencję do tworzenia międzycząsteczkowych wiązań wodorowych co negatywnie wpływa na lotność związków oraz ich stabilność termiczną. W tym celu ekstrakt mitochondrialny (150 μl) przenoszono do szklanej fiołki z mikrowkładem o pojemności 200 μl , a następnie suszono go w wirówce próżniowej (Speedvac, 2 godz., 35°C). Do prób dodano 10 μl roztworu chlorowodoru metoksyaminy (15 mg/ml) w pirydynie. Próby poddano cyklowi intensywnego wytrząsania-mieszania (2 minuty) oraz procesowi sonikacji z zastosowaniem ultradźwięków (20 sekund). Proces powtórzono trzykrotnie. Następnie, próby inkubowano w ciemności przez 16 godzin w temperaturze pokojowej. Po tym czasie przeprowadzono reakcję silylacji poprzez

dodanie 10 µl N,O-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamidu (BSTFA) z 1% trimetylochlorosilanem (TMCS) i inkubację prób w temperaturze 70°C przez 1 godzinę. Po schłodzeniu prób do temperatury pokojowej dodano 50 µl heptanu. Przed analizą GC-MS próby dodatkowo odwirowano (2500 rpm, 20°C, 15 min).

W procesie przygotowania prób do analiz przygotowano również próby kontrolne tzw. *Quality Control Samples* (QC). Próby te stanowiły pulę materiału złożoną z równych objętości wszystkich prób eksperymentalnych. Kolejność prób była losowa (randomizacja) zarówno w procesie ekstrakcji metabolitów jak i analiz.

7.15.2 Rozdział i detekcja metabolitów

Analizy GC-MS wykonano z użyciem systemu chromatografii gazowej (Agilent Technologies 7890A) wyposażonym w autosampler (Agilent 7693) sprzężony ze spektrometrem mas oraz detektorem typu Triple-Axis (5975C, Agilent). W celu otrzymania precyzyjnych i wiarygodnych danych, jak też zminimalizowania ryzyka wystąpienia fałszywie pozytywnych wyników dla każdej próby biologicznej wykonano trzy powtórzenia techniczne.

Próby zerowe zostały przeanalizowane na początku oraz na końcu analiz. Próby kontrolne (QC) posłużyły do wyrównania sygnału na początku sekwencji pomiarów, a następnie zostały analizowane w równych odstępach (co 6 prób) w celu dostarczenia informacji o stabilności systemu. Szczegółowe informacje dotyczące parametrów rozdziału i detekcji zostały przedstawione na rycinie 8. Warunki przeprowadzenia analiz GC-MS zostały zoptymalizowane na podstawie wcześniejszego protokołu (Garcia i Barbas 2011).

GC-MS

Parametry GC:

- Kolumna: DB5-MS (dl. 30 m, śr. 0,25 mm, grubość powłoki 0,25 µm 95% dimetylo-/5% difenylopolisiloksan)
- Przedkolumna: 10m J&W zintegrowana z Agilent 122-5532G
- Prędkość przepływu fazy ruchomej (hel): 1 ml/min
- Temperatura urządzenia dozującego: 250°C
- Stosunek strumienia dzielonego: 1:5 - 1:10 z przepływem helu: 3 - 10 ml/min przez liner z dezaktywowaną włną kwarcową (Restek 20782)
- Gradient temperatury: 60°C przez 1min do 325°C przy zwiększeniu o 10°C/min
- Objętość nastrzyku: 2 µl
- Czas trwania 1 analizy: 37,5min

Parametry MS:

- Linia transferowa detektora: 290°C
- Źródło jonów do jonizacji elektronami (EI) wykonane z inertnego stopu z podwójnym żarnikiem (filamentem), temperatura źródła - 230°C, wiązka elektronów o energii -70eV
- Kwadrupol: 150°C
- Tryb skanowania MS: 2 spektra/s
- Zakres mas: m/z 50 – 600

Ryc. 8 Parametry metody rozdziału mitochondrialnych metabolitów za pomocą GC-MS.

7.15.3 Analiza danych metabolomicznych

Przetwarzanie danych metabolomicznych obejmuje szereg działań prowadzących do otrzymania wyników o wysokiej wiarygodności. Pierwszym etapem było wstępne przygotowanie danych, które miało na celu wzmocnienie stosunku sygnału do szumu. W celu weryfikacji jakości sygnałów szczegółowo przeanalizowano zarejestrowane dane poprzez ewaluację chromatogramów całkowitego prądu jonowego (ang. *total ion chromatograms*, TIC) zarówno prób zerowych, kontrolnych jak i prób eksperymentalnych. Przeanalizowano również rozkład sygnału standardu wewnętrznego w każdej z analizowanych prób. Dekonwolucję sygnałów wykonano zgodnie z algorytmem opracowanym przez firmę Agilent Technologies za pomocą programu Mass Hunter Workstation Software, Quantitative Analysis Ver. B.07.00. W kolejnym kroku analizy dokonano interpretacji otrzymanych widm masowych w celu identyfikacji związków wykrytych w badanych próbach. Widma masowe porównywano na podstawie podobieństwa widm i czasu retencji z biblioteką Fiehn, opracowaną w laboratorium CEMBio bądź z widmami MS dostępnymi w bazie NIST (National Institute of Standards and Technology). Z matrycy danych zostały usunięte związki zidentyfikowane jako zanieczyszczenia (np. Tris, EDTA, sacharoza, DTT) pochodzące z procesu izolacji mitochondriów, z procedury przygotowania prób do analiz GC-MS bądź obecne w próbach zerowych.

Zmiany w rozkładzie sygnału zaobserwowane podczas analiz zostały skorygowane poprzez zastosowanie prób kontrolnych oraz algorytmu opartego na metodzie regresji wektorów nośnych (ang. *support vector regression*) (Kuligowski i wsp. 2015). Następnie dane przefiltrowano wg wartości współczynnika wariacji (ang. *coefficient of variation*, CV) wyliczonego dla każdego metabolitu zidentyfikowanego w próbach kontrolnych. CV o wartości <30% świadczy o precyzji pomiaru danego związku. W celu zniwelowania niepożądanego zmienności biologicznej wynikającej z różnic związanych z ilością dostępnego materiału biologicznego (co przekłada się na różnice w stężeniach poszczególnych metabolitów) dane zostały znormalizowane względem stężenia białka. W kolejnym etapie przeanalizowano sygnał zmierzony dla każdego powtórzenia technicznego i wyliczono wartość średnią sygnału dla każdej próby biologicznej. Tak przygotowaną matrycę danych poddano obliczeniom matematycznym oraz modelowaniu wielowymiarowemu. Badania otrzymanych danych dokonano za pomocą narzędzi statystycznych takich jak analiza czynników głównych (ang. *Principal Component Analysis*, PCA). Jest to tzw. nienadzorowana metoda projekcji, która służy do wizualizacji danych, co pozwala na wyznaczenie relacji między grupami badanymi oraz identyfikację elementów różnicujących grupy. Ponadto zastosowano metodę częściowych największych kwadratów (ang. *Partial Least Squares*, PLS) i ortogonalną PLS (ang. *Orthogonal Partial*

Least Squares, OPLS), które są metodami nadzorowanymi opierającymi się na klasyfikacji obserwacji na podstawie dodatkowego parametru (np. rodzaj grupy badanej, wiek, płeć). Celem ich zastosowania jest rozstrzygnięcie, czy grupy różnią się ze względu na pewną zmienną, a następnie wykorzystanie tej zmiennej do przewidywania przynależności do grupy. Metody PLS i OPLS służą do przewidywania subtelnych różnic między grupami badanymi, co jest przydatne w badaniach poszukujących biomarkerów chorobowych. Jakość modeli została sprawdzona poprzez obliczenie wartości procentu zmienności zestawu danych w modelu R^2 i współczynnika Q^2 , który informuje o zdolności modelu do przewidywania nowych danych.

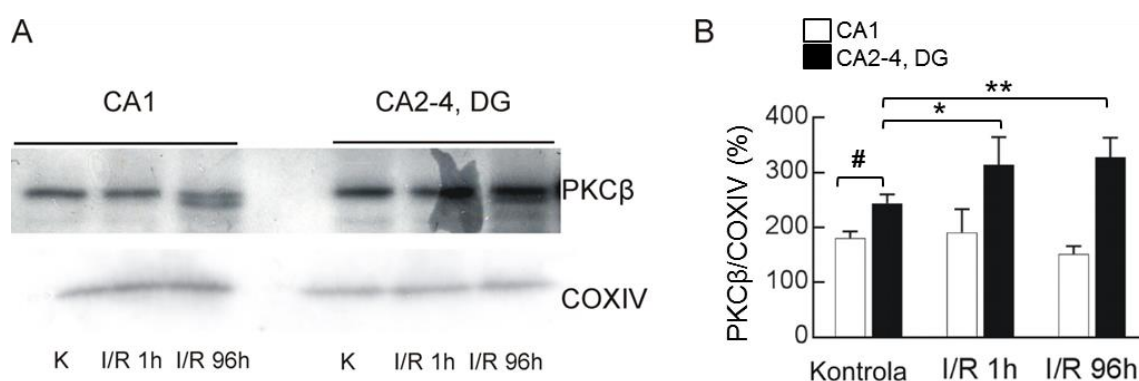
7.16 Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej wszystkich pomiarów dla danej grupy doświadczalnej \pm błąd standardowy średniej. Do oceny istotności statystycznej otrzymanych wyników zastosowano jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA), a do porównań wielokrotnych pomiędzy analizowanymi grupami użyto testu Tukey'a. Wartość $p < 0,05$ przyjęto za istotną. Obliczenia i wizualizacje otrzymanych danych wykonano w programach Microsoft Excel oraz GraphPad Prism.

8. Wyniki

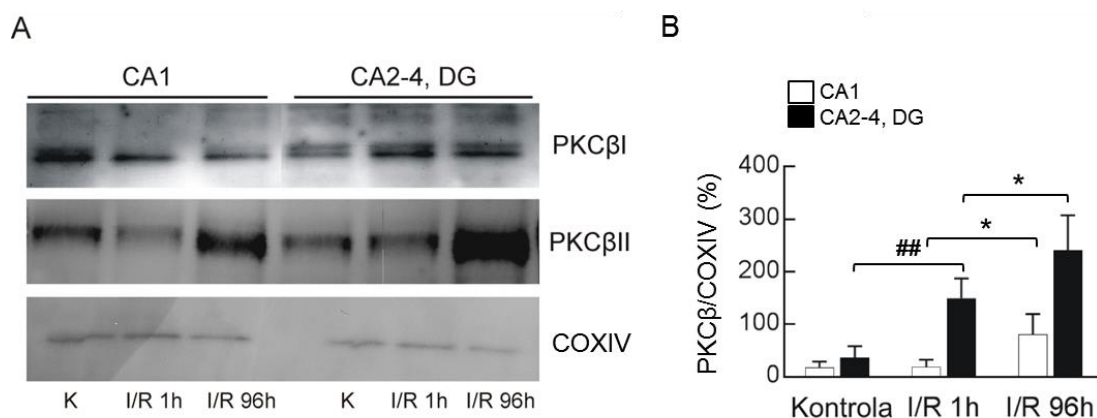
8.1 Immunoreaktywność PKC β i jej izoform w mitochondriach

Analiza immunoreaktywności PKC β w czystej frakcji mitochondrialnej otrzymanej z regionów CA1 i CA2-4, DG zwierząt kontrolnych i poddanych 5-minutowej ischemii i 1- lub 96-godzinnej reperfuzji potwierdziły dotychczasowe wyniki Kowalczyk i wsp. (2012) wskazujące, iż na skutek krótkotrwałego epizodu ischemiczno-reperfuzyjnego mózgu, immunoreaktywność PKC β zwiększa się przede wszystkim w mitochondriach izolowanych z mało wrażliwego na ischemię regionu hipokampa - CA2-4, DG (Ryc. 9).



Ryc. 9 (A) Wzrost immunoreaktywności PKC β obserwowany jest w mitochondriach w części CA2-4, DG hipokampa zwierząt poddanych 5-minutowej ischemii oraz 1- i 96-godzinnej reperfuzji (I/R 1h, I/R 96h). Frakcje mitochondrialne (20 μ g białka) rozdzielano w 10% żelu SDS-PAGE i analizowano metodą western blot z użyciem przeciwciał anty-PKC β i anty-COXIV. Na wykresie (B) przedstawiono wyniki analizy densytometrycznej prążków PKC β II znormalizowane względem wartości uzyskanych dla COXIV. Wartości są wyrażone jako średnia \pm SD (%), n=5. * p <0,05 I/R 1h CA2-4, DG vs kontrola CA2-4, DG; ** p <0,01 I/R 96h CA2-4, DG vs kontrola CA2-4, DG; # p <0,05 kontrola CA2-4, DG vs kontrola CA1.

W celu sprawdzenia, czy obserwowane zmiany w immunoreaktywności PKC β dotyczą obu jej izoform wykonano dodatkowe analizy western blot z użyciem przeciwciał anty-PKC β I i anty-PKC β II. Wykazano, że po epizodzie niedokrwiennym, to immunoreaktywność PKC β II a nie PKC β I ulega zwiększeniu w mitochondriach wyizolowanych z regionu CA2-4, DG hipokampa (Ryc. 10). Immunoreaktywność PKC β II zwiększyła się istotnie statystycznie w stosunku do kontroli w mitochondriach z części CA2-4, DG w obu punktach czasowych – 1 godzina ($150 \pm 37\%$) i 96 godzin ($240 \pm 66\%$) po reperfuzji. W mitochondriach regionu CA1 zaobserwowano wzmocnienie sygnału PKC β II w stosunku do kontroli, ale jedynie po 96 godz. od reperfuzji ($81 \pm 38\%$).



Ryc. 10 (A) Wzrost immunoreaktywności PKC β II obserwowany jest głównie w mitochondriach w części CA2-4, DG hipokampa zwierząt poddanych 5-minutowej ischemii oraz 1- lub 96-godzinnej reperfuzji (I/R 1h, I/R 96h). Frakcje mitochondrialne (20 μ g) rozdzielano w 10% żelu SDS-PAGE i analizowano metodą western blot używając przeciwciał anti-PKC β I, anti-PKC β II i anti-COXIV. (B) Dane liczbowe uzyskane z analizy densytometrycznej przedstawiono jako procent COXIV (średnia \pm SD, n=4). * p <0,05 I/R 96h CA1 vs I/R 1h CA1 oraz I/R 96h CA2-4, DG vs I/R 1h CA2-4, DG; ## p <0,01 I/R 1h CA2-4, DG vs kontrola CA2-4, DG.

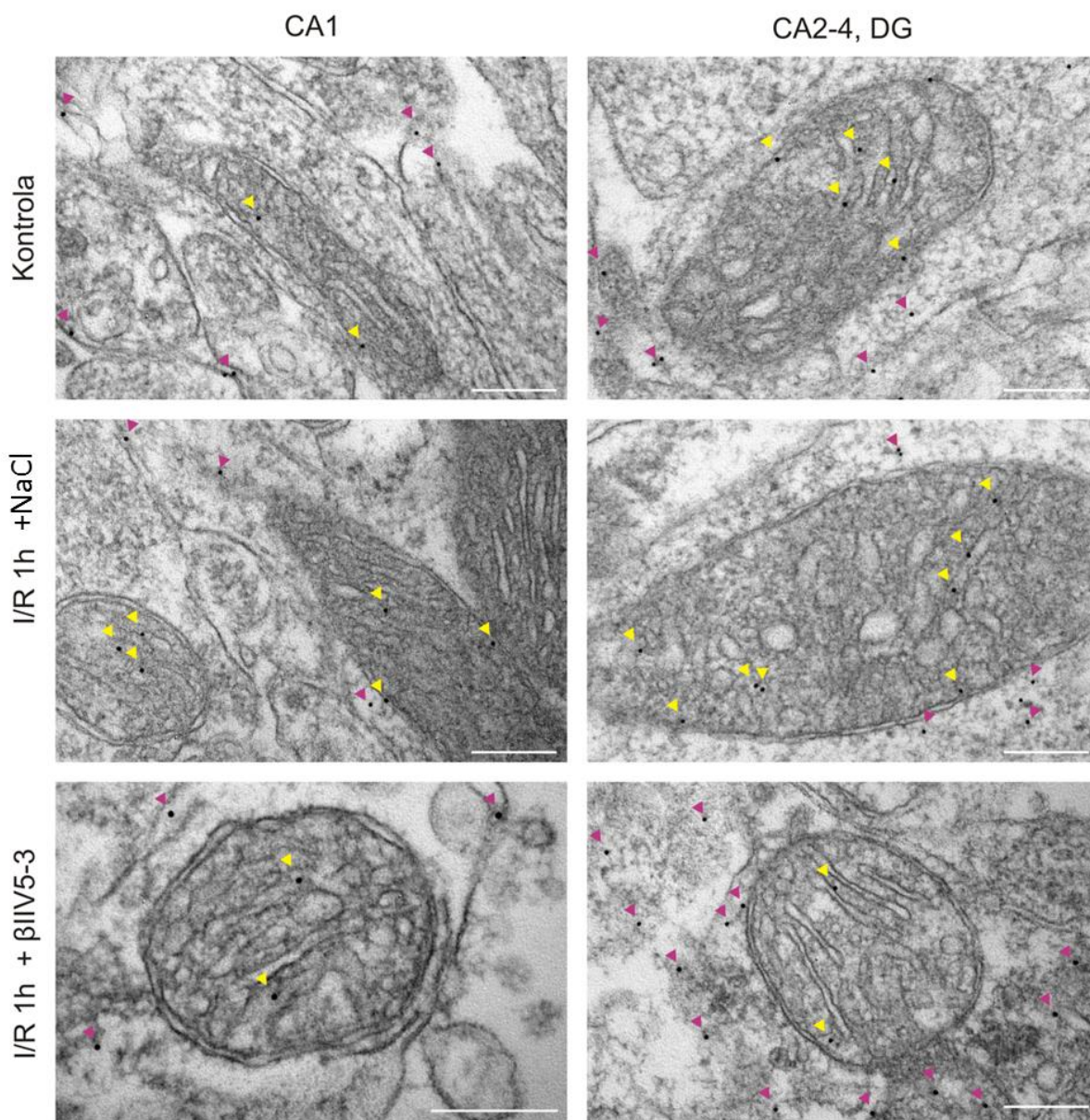
8.2 Badanie translokacji PKC β II do mitochondriów po krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu

W celu sprawdzenia, czy poischemiczne zmiany immunoreaktywności PKC β II obserwowane w analizie western blot wynikają z przemieszczenia się tej kinazy z cytoplazmy do mitochondriów wykonano szereg doświadczeń (obrazowanie zmian lokalizacji PKC β II za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz badanie immunoreaktywności PKC β II we frakcji błonowej - P2 i cytosolowej – S2 oraz mitochondrialnej) z użyciem specyficznego inhibitora PKC β II – peptydu β IIV5-3. Peptyd ten, przyłączając się do białka RACK1 uniemożliwia jego oddziaływanie z PKC β II i tym samym translokację tej kinazy do wybranych przedziałów komórkowych. Do doświadczeń użyto trzech grup zwierząt: kontrolnej (K), poddanej 5-minutowej ischemii i jednogodzinnej reperfuzji (I/R 1h +NaCl) oraz takiej, której dodatkowo podano inhibitor β IIV5-3 bezpośrednio po przywróceniu krążenia (I/R 1h + β IIV5-3). Przypuszczono, że podanie inhibitora zadziała hamująco na przyrost ilości PKC β II w mitochondriach obserwowany po I/R. Tym samym, hipoteza o przemieszczeniu się PKC β II z cytoplazmy do mitochondriów zostałaby potwierdzona.

8.2.1 Obrazowanie zmian lokalizacji PKC β II po epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Do określenia zmian lokalizacji PKC β II użyto technikę znakowania białek przeciwciałami sprzężonymi ze złotem koloidalnym. W skrawkach kontrolnych regionu CA1 i CA2-4, DG

hipokampa cząsteczki złota były widoczne przeważnie w cytoplazmie i w niewielkiej ilości w mitochondriach (Ryc. 11). Po jednej godzinie od przywrócenia krążenia stwierdzono zwiększoną liczbę cząsteczek złota w mitochondriach głównie w części CA2-4, DG w porównaniu do cytoplazmy.



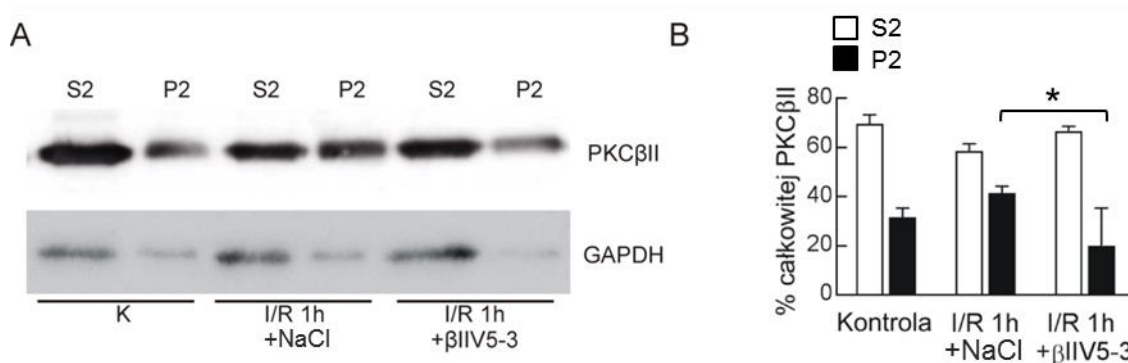
Ryc. 11 Mikrografie elektronowe ilustrujące lokalizację PKC β II w mitochondriach w częściach CA1 i CA2-4, DG hipokampa zwierząt kontrolnych oraz poddanych 5-minutowej ischemii i 1-godzinnej reperfuzji (I/R 1h + NaCl) oraz po zastosowaniu inhibitora (I/R 1h + β IIV5-3). Żółte strzałki wskazują mitochondrialną lokalizację PKC β II. Strzałki czerwone wskazują na immunodetekcję poza mitochondriami. Skala: 200 nm.

W skrawkach CA1 i CA2-4, DG hipokampa zwierząt, którym bezpośrednio po I/R podano inhibitor β IIV5-3 zaobserwowano małą ilość cząsteczek złota w mitochondriach w porównaniu

do cytoplazmy. Obraz ten zbliżony był do kontroli, co może świadczyć o zahamowaniu poischemicznej translokacji PKC β II do mitochondriów. Po inkubacji skrawków jedynie z drugorzędowym przeciwciałem skoniugowanym z koloidalnym złotem nie zaobserwowano sygnału, co wskazuje na wysoką specyficzność oddziaływania przeciwciała pierwszorzędowego z PKC β II oraz brak niespecyficjnej reakcji drugorzędowego przeciwciała.

8.2.2 Wpływ inhibitora β IIV5-3 na translokację PKC β II do frakcji błonowej wzbogaconej w mitochondria

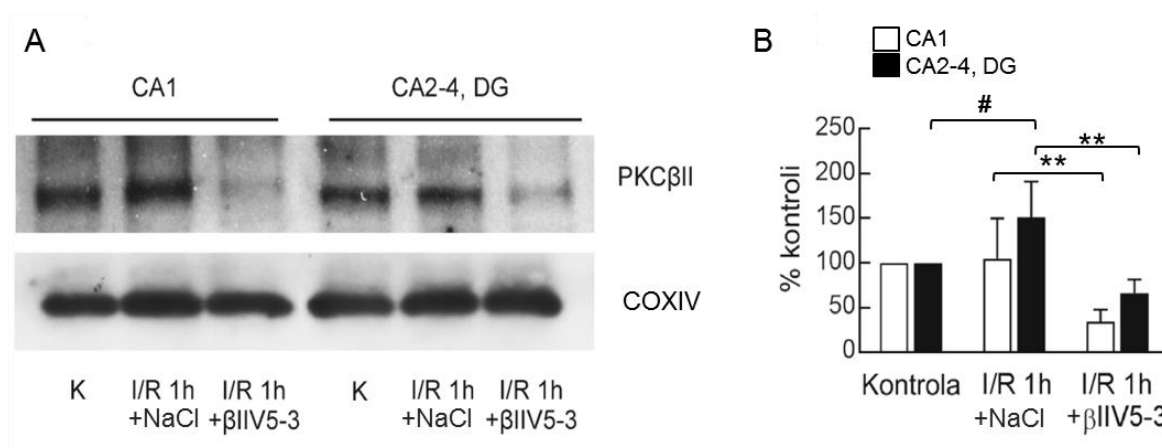
W celu potwierdzenia wyników otrzymanych w mikroskopie elektronowym wykonano analizę western blot dla PKC β II we frakcjach cytosolowej (S2) i błonowej wzbogaconej w mitochondria (P2). Po epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym widoczne jest zwiększenie immunoreaktywności PKC β II we frakcji P2 oraz jednocześnie jej zmniejszenie w S2. Natomiast po podaniu inhibitora β IIV5-3 obserwowano zmniejszenie immunoreaktywności PKC β II we frakcji P2 o $80 \pm 15\%$ co świadczy o skutecznym zahamowaniu translokacji PKC β II do błon komórkowych.



Ryc. 12 Inhibitor β IIV5-3 hamuje translokację PKC β II do frakcji błonowej wzbogaconej w mitochondria. (A) Frakcje cytosolowe (S2) i błonowe (P2) otrzymane z hipokampów zwierząt kontrolnych oraz poddanych 5 minutowej ischemii i 1h reperfuzji I/R (I/R 1h + NaCl) oraz po zastosowaniu inhibitora (I/R 1h + β IIV5-3), rozdzielano w 10% żelu SDS-PAGE i analizowano metodą western blot używając przeciwciał anty-PKC β II i anty-GAPDH. Na wykresie (B) przedstawiono dane z analizy densytometrycznej wyrażone jako procent całkowitej PKC β II (średnia \pm SD, n=4). *p<0,05 I/R 1h + β IIV5-3 CA2-4, DG vs I/R 1h + NaCl CA2-4, DG.

8.2.3 Wpływ inhibitora β IIV5-3 na immunoreaktywność PKC β II we frakcji mitochondrialnej

Dodatkowo wykonano analizę western blot dla PKC β II w czystej frakcji mitochondrialnej. Zastosowanie β IIV5-3 skutkowało zmniejszeniem immunoreaktywności PKC β II w mitochondriach CA1 o $54 \pm 13\%$ a w CA2-4, DG o $34 \pm 15\%$ w stosunku do kontroli (Ryc. 13).

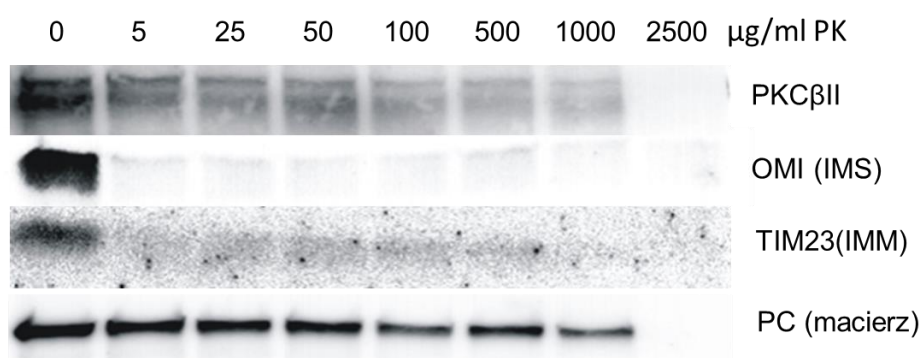


Ryc. 13 Inhibitor β IIV5-3 zmniejsza poischemiczną immunoreaktywność PKC β II w mitochondriach (A) Frakcje mitochondrialne (20 μ g) otrzymane z hipokampów zwierząt kontrolnych oraz poddanych 5-minutowej ischemii i 1-godzinnej reperfuzji I/R (I/R 1h + NaCl) oraz po zastosowaniu inhibitora (I/R 1h + β IIV5-3), rozdzielano w 10% żelu SDS-PAGE i analizowano metodą western blot używając przeciwciał anti-PKC β II i anti-COXIV. (B) Intensywność prążków PKC β II wyrażono jako procent kontroli (średnia \pm SD, n=4). **p<0,01 I/R 1h + β IIV5-3 CA1 vs I/R 1h + NaCl CA1 oraz I/R 1h + β IIV5-3 CA2-4, DG vs I/R 1h + NaCl CA2-4, DG; #<0,05 I/R 1h + NaCl CA2-4, DG vs kontrola CA2-4, DG.

8.3 Wewnątrzmitochondrialna lokalizacja PKC β II po epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym

Zastosowanie testu dostępności badanego białka dla proteinazy K posłużyło do określenia dokładnej lokalizacji PKC β II w obrębie mitochondriów po I/R. Białka budujące mitochondria, ze względu na swoje położenie w tej złożonej strukturze, reprezentują zróżnicowaną wrażliwość na trawienie proteinazą K. Wrażliwość danego białka objawia się charakterystycznym „wzorem trawienia” w postaci prążków o różnej intensywności w analizie western blot. Do badania wykorzystano frakcje mitochondrialne wyizolowane z hipokampów zwierząt poddanych krótkotrwałej ischemii i reperfuzji (I/R 1h), które trawiono stosując enzym w różnych stężeniach. W celu wyznaczenia lokalizacji PKC β II przeprowadzono szereg analiz western blot identyfikujących białka o znanej lokalizacji w mitochondriach. Jak pokazano

na Ryc. 14, immunoreaktywność białka OMI, znajdującego się w przestrzeni pomiędzy błonami mitochondrialnymi, znacząco zmniejsza się już po trawieniu najmniejszym stężeniem proteiny K, co świadczy o łatwym dostępie tego enzymu do analizowanego białka. Podobnie zmienia się immunoreaktywność TIM23, która jest elementem systemu transportującego białka przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Najmniej, w zadanych warunkach doświadczenia, zmieniała się immunoreaktywność karboksylazy pirogronianowej (PC), co świadczy o lokalizacji tego białka w najtrudniej dostępnym dla proteiny K obszarze mitochondriów - macierzy. Wzór trawienia PKC β II przez proteinę K wykazuje największe podobieństwo do wzoru trawienia karboksylazy pirogronianowej (Ryc. 14). Otrzymany wynik sugeruje, że PKC β II po upływie jednej godziny od 5 minutowej ischemii znajduje się w macierzy mitochondrialnej.



Ryc. 14 Po epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym PKC β II lokalizuje się w macierzy mitochondrialnej. Frakcje mitochondrialne (25 μ g), uzyskane z całych hipokampów po jednej godzinie od przywrócenia krążenia, zostały poddane reakcji trawienia z użyciem różnych stężeń proteiny K (0 - 2500 μ g/ml). Następnie mieszaniny reakcyjne (33 μ l/studzienka) rozdzielano w 10% żelu Criterion TGX (Bio-Rad) i analizowano metodą western blot z użyciem przeciwciał anti-PKC β II, anti-OMI, anti-TIM23, anti-PC. IMS-przestrzeń międzybłonowa mitochondriów, IMM- wewnętrzna błona mitochondrialna.

8.4 Prawdopodobieństwo występowania sekwencji kierującej do mitochondriów w łańcuchu peptydowym PKC β II







W celu sprawdzenia w jaki sposób PKC β II może przenosić się do mitochondriów przeprowadzono analizę *in silico* z wykorzystaniem programu komputerowego MitoFates, który służy do identyfikacji klasycznych sekwencji kierujących białka do mitochondriów tzw. presekwencji. Do analizy użyto pełnych sekwencji aminokwasowych: PKC β II oraz czwartej podjednostki oksydazy cytochromowej, jako pozytywnej kontroli. Parametry analizy takie jak mała wartość ładunku, małe prawdopodobieństwo występowania amfipatycznej helisy, brak sekwencji aminokwasowej rozpoznawanej przez TOM20 wpłynęły na otrzymanie wartości prawdopodobieństwa obecności presekwencji w białku PKC β II równej 0 (Tabela 5). Otrzymany

wynik oznacza, że w sekwencji aminokwasowej badanej kinazy nie ma klasycznej sekwencji kierującej do mitochondriów. Natomiast w przypadku podjednostki oksydazy cytochromowej, o której wiadomo, że jest transportowana do mitochondriów, wartość wynosiła 0,999 – co oznacza, że w sekwencji tego białka występuje klasyczna sekwencja kierująca do mitochondriów.

Tabela 5 Przewidywanie występowania presekwencji kierującej do mitochondriów w białku PKC β II. Na podstawie wyników z programu MitoFate.

Numer dotępu bazy Uniprot	P10888	P68403-2
Organizm	Szczur	Szczur
Nazwa białka	Oksydaza cytochromu c, podjednostka 4, izoforma 1	Kinaza białkowa C β II
Przewidywanie	posiada sekwencję kierującą do mitochondriów	nie posiada sekwencji kierującej do mitochondriów
Prawdopodobieństwo o obecności presekwencji (0 - 1,000)	0,999	0
Pozycje aminokwasów odpowiadające: 1. sekwencji rozpoznawanej przez TOM20	od 3 do 7	brak
2. przewidywanym miejscom odcięcia presekwencji	14, 21	43
3. amfipatycznej alfa helisie	od 2 do 12 (wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia helisy)	od 1 do 10 (niskie prawdopodobieństwo wystąpienia helisy)
Ładunek	0,214	0,07
Sekwencja 25 aminokwasów końca aminowego białka z zaznaczonymi charakterystycznymi motywami	M L A T R A L S L I G K R A I S T S V C L R A H G M L A T R A L S L I G K R A I S T S V C L R A H G M L A T R A L S L I G K R A I S T S V C L R A H G M L A T R A L S L I G K R A I S T S V C L R A H G M L A T R A L S L I G K R A I S T S V C L R A H G M L A T R A L S L I G K R A I S T S V C L R A H G	M A D P A A G P P P S E G E E E S T V R F A R K G A M A D P A A G P P P S E G E E E S T V R F A R K G A

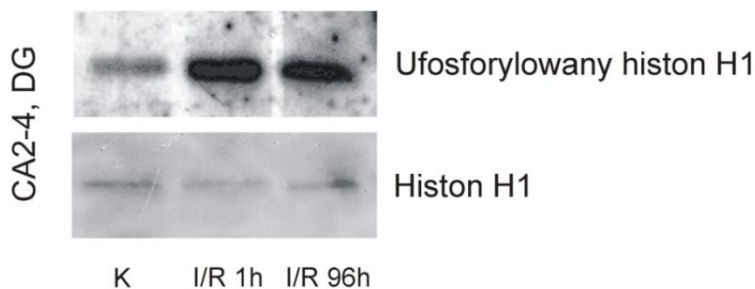
Legenda:

	sekwencja rozpoznwana przez TOM20		aminokwasy:
	wysokie prawdopodobieństwo występowania dodatniego ładunku i amfifilowości		zasadowe
	niskie prawdopodobieństwo występowania dodatniego ładunku i amfifilowości		hydrofobowe
			polarne

8.5 Aktywność enzymatyczna PKC β II we frakcji mitochondrialnej

Ustalenie lokalizacji PKC β II w mitochondriach po reperfuzji nie rozstrzyga o jej aktywności katalitycznej w tych organellach. Dlatego wykonano test aktywności *in vitro* poprzez

oznaczenie fosforylacji histonu H1 katalizowanej przez PKC β II. Do reakcji fosforylacji użyto PKC β II wyizolowanej z mitochondriów CA2-4, DG hipokampa pozyskanych po 1 (I/R 1h) i 96 godzinach (I/R 96h) reperfuzji oraz histonu H1 i ATP jako substratów. Miarą aktywności enzymatycznej PKC β II była ilość wytworzonego ufosforylowanego histonu H1. Jak przedstawiono na Ryc 15 wykazano przyrost fosforylacji histonu H1 w próbach zawierających PKC β II wyizolowaną zarówno po 1 jak i po 96 godzinach od I/R w porównaniu do enzymu izolowanego z kontrolnych mitochondriów (Ryc. 15).



Ryc. 15 PKC β II obecna w mitochondriach jest aktywna enzymatycznie. PKC β II (z kontrolnych - K i ischemicznych - I/R 1h, 96h mitochondriów regionu CA2-4, DG) immunoprecypitowano, a następnie inkubowano z mieszaniną reakcyjną zawierającą histon H1 oraz ATP. Otrzymany eluat poddano analizie western blot z użyciem przeciwciał rozpoznających ufosforylowany oraz nieufosforylowany histon H1. Widoczne prążki ufosforylowanego histonu H1 w próbach I/R 1h i I/R 96 h świadczą o tym, że PKC β II wyizolowana po I/R wykazuje aktywność enzymatyczną. n=3.

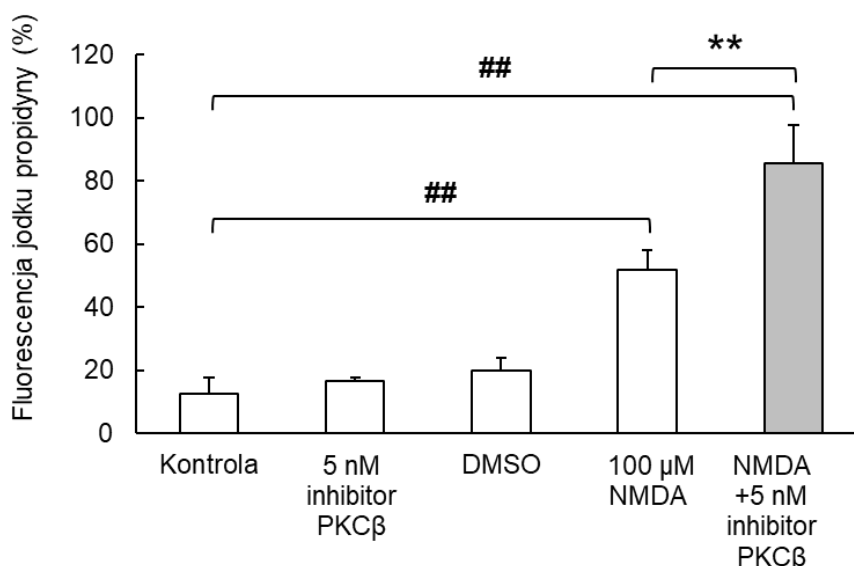
Jednocześnie nie zaobserwowano zmian immunoreaktywności samego histonu H1, co potwierdza, że widoczne zmiany fosforylacji nie wynikają z różnej zawartości tego substratu w mieszaninach reakcyjnych. Zatem wynik ten oznacza, że po niedokrwieniu i reperfuzji w mitochondriach zwiększa się całkowita aktywność enzymatyczna PKC β II, co może być związane z jej poischemiczną translokacją do tych organelli.

8.6 Biologiczne skutki zahamowania aktywności enzymatycznej PKC β II

Do poznania efektu biologicznego obecności PKC β II w mitochondriach wykorzystano narzędzia farmakologiczne oddziałujące na aktywność PKC. Doświadczenie posłużyło sprawdzeniu czy zahamowanie aktywności badanej kinazy wpłynie na uszkodzenie komórek nerwowych hipokampa w modelach: niedokrwienia mózgu *in vivo* i stresu ekscytotoksycznego *in vitro*.

8.6.1 Badanie z użyciem modelu ekscytotoksyczności w skrawkach hipokampa szczura

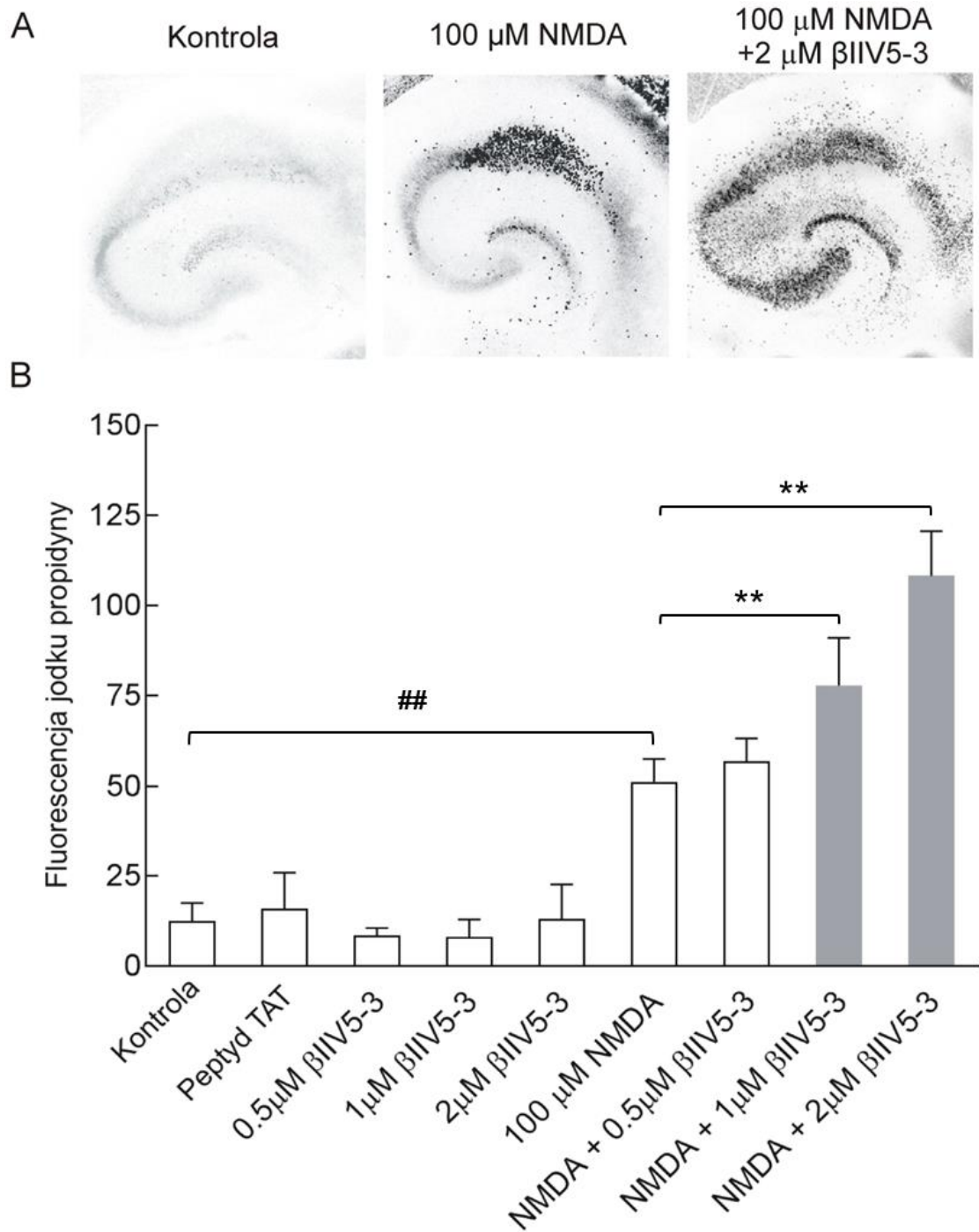
W modelu uszkodzenia ekscytotoksycznego w organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura, skrawki traktowano 100 μ M NMDA w obecności 5 nM inhibitora PKC β II 257879-35-9 (Tanaka i wsp. 2004). Wartości przedstawiono jako procent maksymalnej intensywności fluorescencji jodku propidyny otrzymanej przy podaniu 500 μ M NMDA.



Ryc. 16 Inhibitor PKC β (257879-35-9) pogłębia uszkodzenie zainicjowane przez 100 μ M NMDA. Organotypowe skrawki hipokampa inkubowano z 100 μ M NMDA lub mieszaniną 100 μ M NMDA i 5 nM inhibitora PKC β przez 3 godziny. Po 24h, po podaniu jodku propidyny skrawki fotografowano i zliczano intensywności fluorescencji. Wartości intensywności fluorescencji poszczególnych skrawków przedstawiono jako procent maksymalnej fluorescencji otrzymanej przy podaniu 500 μ M NMDA (średnia \pm SD z 3-4 doświadczeń, przy czym w każdym doświadczeniu analizowano 6-15 skrawków dla poszczególnych warunków doświadczalnych). ** p <0,01 NMDA+5 nM inhibitor PKC β vs 100 μ M NMDA, ## p <0,01 100 μ M NMDA vs kontrola oraz NMDA+5 nM inhibitor PKC β vs kontrola.

Jak przedstawiono na Ryc. 16 inhibitor pogłębiał uszkodzenie pierwotnie wywołane działaniem NMDA o 33% w porównaniu do uszkodzenia wywołanego przez NMDA. Natomiast sam inhibitor lub stosowany rozpuszczalnik – 0,1% DMSO nie wykazywał toksyczności.

W drugim etapie doświadczeń skrawki w hodowli organotypowej traktowano 100 μ M NMDA w obecności peptydowego inhibitora PKC β II (β IIV5-3 w stężeniach 0,5; 1; 2 μ M). W skrawkach poddanych działaniu 100 μ M NMDA obserwowano uszkodzenie większe o 39% od kontroli, zlokalizowane głównie w regionie CA1 hipokampa (Ryc. 17). Ekspozycja skrawków na działanie 100 μ M NMDA w obecności inhibitora β IIV5-3 w stężeniu 1 i 2 μ M spowodowało zwiększenie uszkodzenia odpowiednio o 65 \pm 13 % i o 96 \pm 12% w porówniu do kontroli.

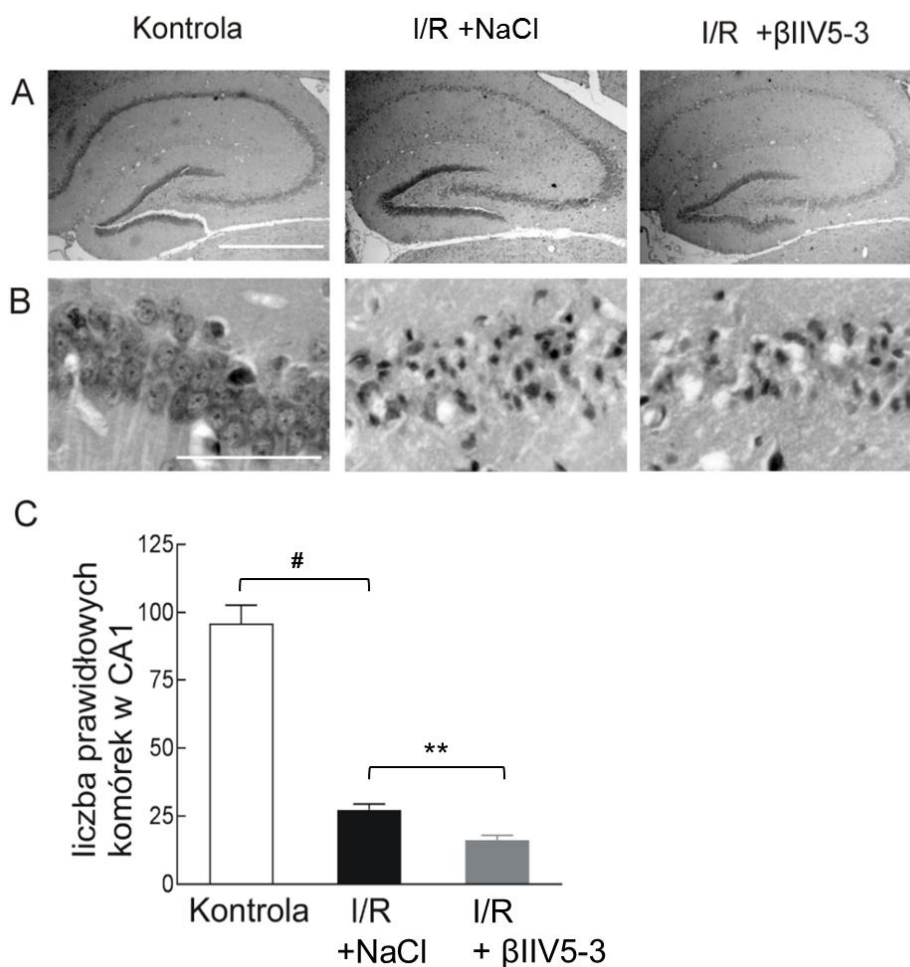


Ryc. 17 Inhibitor β IIV5-3 pogłębia uszkodzenie skrawków hipokampa szczura wywołane przez NMDA. (A) Jodek propidyny barwi martwe komórki w skrawkach kontrolnych, poddanych działaniu 100 μ M NMDA oraz 100 μ M NMDA i inhibitora β IIV5-3 (NMDA+ β IIV5-3), co widoczne jest na zdjęciach w postaci czarnych punktów. (B) Wartości intensywności fluorescencji poszczególnych skrawków przedstawiono jako procent maksymalnej fluorescencji otrzymanej przy podaniu 500 μ M NMDA. Dane wyrażone jako średnia \pm SD z 3-4 doświadczeń, przy czym w każdym doświadczeniu analizowano 9-12 skrawków dla poszczególnych warunków doświadczalnych. ** p <0,01 NMDA + 2 μ M β IIV5-3 vs NMDA oraz NMDA + 1 μ M β IIV5-3 vs NMDA, ### p <0,01 100 μ M NMDA vs kontrola.

Martwe komórki były widoczne zarówno w regionie CA1 hipokampa, jak i CA2-4, DG. Inhibitor w stężeniu 0,5 μM nie wpłynął znacząco na zwiększenie stopnia uszkodzenia w stosunku do obserwowanego po podaniu NMDA ($51 \pm 6\%$ vs kontrola). Peptyd TAT (1 μM), który zapewnia wniknięcie $\beta\text{IIV5-3}$ do komórki, nie wykazał toksyczności, podobnie jak inhibitor podany do pożywki hodowlanej bez NMDA.

8.6.2 Badanie z użyciem modelu całkowitego niedokrwienia mózgu myszokoczka mongolskiego

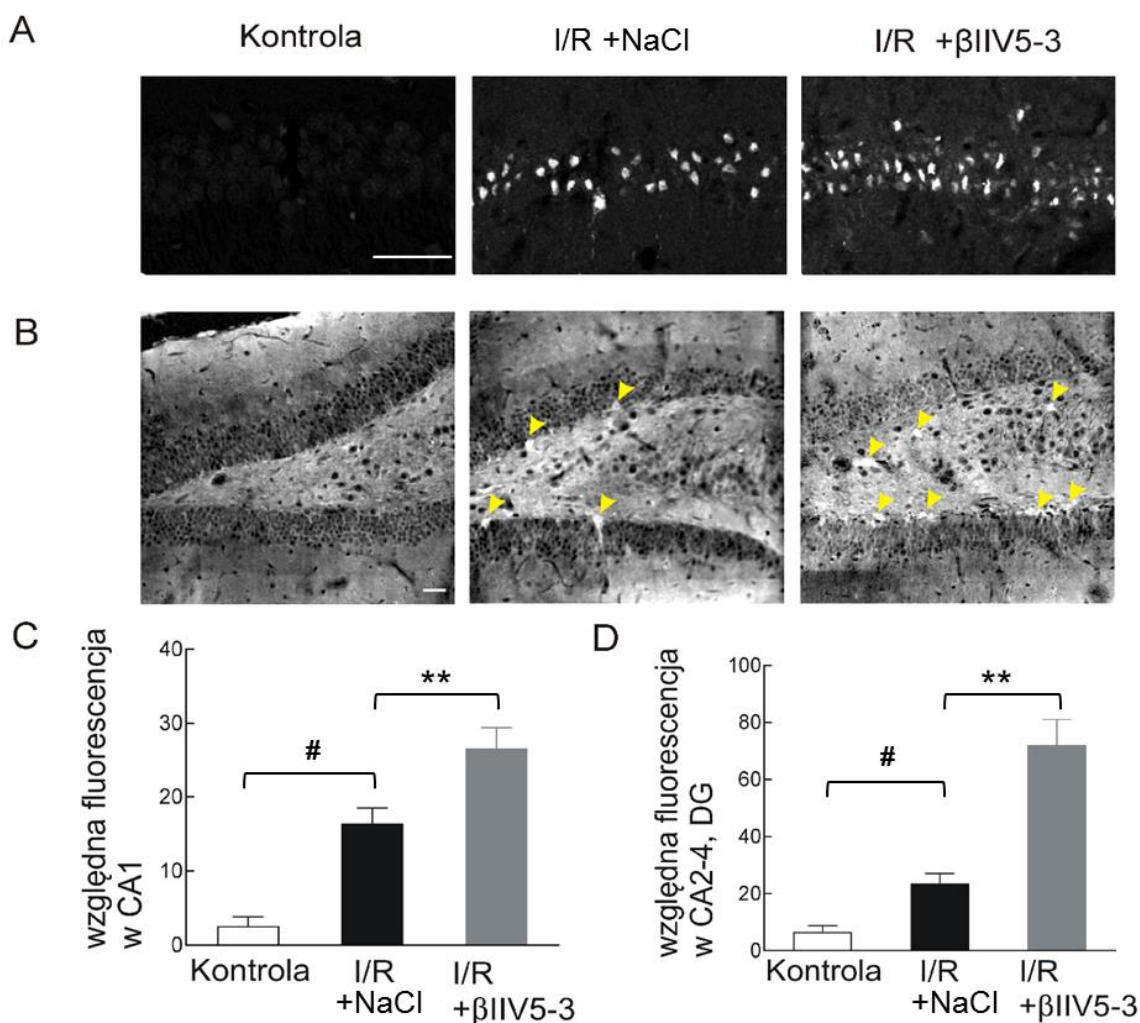
W kolejnym etapie przeprowadzono badania *in vivo* z wykorzystaniem peptydowego inhibitora oceniające wpływ aktywności PKC βII na przeżycie neuronów po epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym. Do doświadczenia użyto trzech grup zwierząt: kontrolnej, poddanej 5-minutowej ischemii i 7-dniowej reperfuzji (I/R + NaCl) oraz takiej, której dodatkowo bezpośrednio po przywróceniu krążenia podawano inhibitor PKC βII (I/R + $\beta\text{IIV5-3}$) w dawce 3 mg/kg masy ciała. Po siedmiu dniach od epizodu ischemicznego przeprowadzono barwienie skrawków mózgu hematoksyliną i eozyną (H/E). W mózgach zwierząt kontrolnych, w regionie CA1 hipokampa, zaobserwowano $96 \pm 7\%$ prawidłowych morfologicznie neuronów, u zwierząt poddanych I/R jedynie $27 \pm 2\%$, natomiast podanie inhibitora $\beta\text{IIV5-3}$ spowodowało zwiększenie uszkodzenia – tylko $16 \pm 1\%$ neuronów CA1 przeżyło epizod niedokrwienności (Ryc. 18). W skrawkach wybarwionych H/E nie zaobserwowano znaczących zmian w regionie CA2-4, DG hipokampa.



Ryc. 18 Inhibitor β IIV5-3 pogłębia rozległość uszkodzenia wywołanego krótkotrwałym niedokrwieniem mózgu myszokoczka. Zwierzętom poddanym krótkotrwałej ischemii podawano jednorazowo odpowiednio: sól fizjologiczną (I/R + NaCl) lub inhibitor β IIV5-3 (I/R + β IIV5-3) w dawce 3 mg/kg masy ciała. Po 7 dniach od przywrócenia krążenia zwierzęta perfundowano 4% PFA w PBS i skrawki mózgowi zatopione w parafinie barwiono hematoksyliną i eozyną (H/E). (A) Hipokampy barwione H/E oraz (B) powiększenie neuronów piramidowych regionu CA1 hipokampa. Skala: 50 μ m. (C) Rozległość uszkodzenia CA1 została określona poprzez zliczenie prawidłowych morfologicznie neuronów w trzech obszarach regionu CA1 o długości 200 μ m i wyrażona jako średnia liczba prawidłowych komórek \pm SD ($n=3$), ** $p<0,01$ I/R + β IIV5-3 vs I/R + NaCl, # $p<0,05$ I/R + NaCl vs kontrola.

Dodatkowo skrawki mózgowi pochodzące od zwierząt opisanych powyżej testowano pod kątem fragmentacji DNA stosując metodę TUNEL (Ryc. 19). Technika ta uzupełniła wyniki uzyskane za pomocą barwienia H/E. W 7 dni po epizodzie niedokrwinnym w regionie CA1 odnotowano znaczące zwiększenie liczby komórek apoptotycznych do wartości $16 \pm 2\%$ w porównaniu do kontroli, a zastosowanie β IIV5-3 zwiększyło tę wartość do $27 \pm 3\%$. Ponadto, barwienie TUNEL umożliwiło zaobserwowanie trzykrotnego wzmocnienia fluorescencji w regionie CA2-4, DG hipokampa zwierząt poddanych działaniu β IIV5-3 w porównaniu do zwierząt poddanych I/R, co świadczy o uszkodzeniu neuronów również i w tym regionie

hipokampa. Podsumowując, zahamowanie translokacji PKC β II do mitochondriów powoduje zwiększenie śmiertelności komórek w regionach CA1 i CA2-4, DG hipokampa zarówno w modelu *in vitro* jak i *in vivo*.



Ryc. 19 Inhibitor PKC β II pogłębia proces apoptozy wywołanej krótkotrwałym niedokrwieniem mózgu myszokoczka. Podczas krótkotrwałego niedokrwienia mózgu zwierzętom podawano: sól fizjologiczną (I/R + NaCl) lub inhibitor β IIV5-3 (I/R + β IIV5-3 w dawce 3 mg/kg masy ciała). Po 7 dniach od przywrócenia krążenia zwierzęta perfundowano zimnym 4% PFA w PBS i izolowano skrawki mózgu, które barwiono metodą TUNEL. (A) Komórki apoptotyczne w CA1 hipokampa są widoczne jako jasne punkty, a w regionie DG dodatkowo wskazane są strzałkami (B). Wykresy (C, D) ilustrują wyniki analizy komórek TUNEL-pozytywnych wyrażonych jako średnia względnej fluorescencji \pm SD, (n=3) **p<0,01 I/R + β IIV5-3 vs I/R + NaCl, #<0,05 I/R + NaCl vs kontrola.

8.7 Badanie mechanizmu endogennej neuroprotekcji, którego elementem jest PKC β II

Jak pokazano w wyżej zaprezentowanych badaniach, przeżycie komórek po krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu w regionie CA2-4, DG hipokampa może być związane z

translokacją PKC β II do mitochondriów oraz jej aktywnością w tych organellach. Wydaje się, że badana kinaza może oddziaływać z białkami mitochondrialnymi i poprzez wpływ na ich aktywność prowadzić do ochrony komórek nerwowych. W celu poznania szczegółów neuroprotektynowego mechanizmu działania PKC β II wykonano szereg doświadczeń mających na celu wytypowanie białek, z którymi może oddziaływać badany enzym oraz skutków metabolicznych takich oddziaływań np.: zmiany w ilości substratów energetycznych czy szkodliwych związków powstających podczas I/R.

8.7.1 Wytypowanie potencjalnych mitochondrialnych partnerów PKC β II

W celu identyfikacji białek mitochondrialnych, które potencjalnie mogą oddziaływać z PKC β II wykorzystano metodę chromatografii powinowactwa typu pull-down i analizę spektrometrii mas. W metodzie tej wykorzystano rekombinowaną PKC β II sprzęgniętą z CNBr-sefarozą oraz białka wyekstrahowane z czystej frakcji mitochondriów otrzymanych z kontrolnych hipokampów myszokoczka. Na podstawie trzech niezależnych doświadczeń analizowanych jednocześnie wytypowano 10 białek mitochondrialnych, które mogą potencjalnie oddziaływać z PKC β II (Tabela 6).

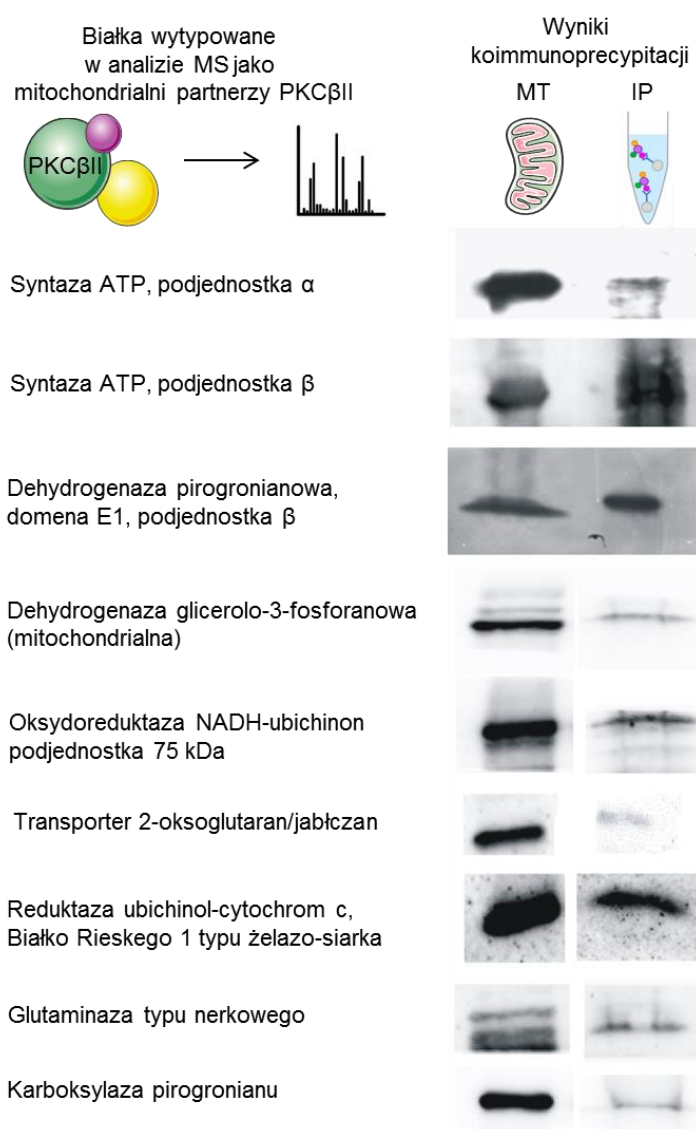
Tabela 6 Białka mitochondrialne, z którymi może oddziaływać PKC β II, wytypowane metodami chromatografii powinowactwa i spektrometrii mas.

Numer dostępu bazy Uniprot	Nazwa białka	Funkcja
P15999	Syntaza ATP, podjednostka α	Katalizuje reakcję syntezy ATP. Jest częścią domeny F1, tzw. kompleksu V.
P10719	Syntaza ATP, podjednostka β	Katalizuje reakcję syntezy ATP. Jest częścią domeny F1, tzw. kompleksu V.
P49432	Dehydrogenaza pirogronianowa, domena E1, podjednostka β	Katalizuje oksydacyjną dekarboksylację pirogronianu.
P35571	Dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa (mitochondrialna)	Katalizuje utlenienie glicerolo-3-fosforanu do fosfodihydroksyacetanu. Element wahadła glicerolo-3-fosforanowego (transport równoważników redukujących z cytoplazmy do mitochondriów).
Q66HF1	Oksydoreduktaza NADH-ubichinon, podjednostka 75 kDa	Element kompleksu I łańcucha oddechowego. Przenosi elektrony z NADH na ubichinon.
P97700	Transporter 2-oksoglutaran/jabłczan	Wymienia jabłczan na 2-oksoglutaran przez wewnętrzną błonę mitochondrialną
P20788	Reduktaza ubichinol-cytochrom c, Białko Rieskego 1 typu żelazo-siarka	Element kompleksu III łańcucha oddechowego. Przenosi elektrony z NADH na ubichinon.
P13264	Glutaminaza typu nerkowego	Katalizuje reakcję deamidacji glutaminy do kwasu glutaminowego.
P52873	Karboksylaza pirogronianu	Katalizuje przyłączenie CO ₂ do pirogronianu z utworzeniem szczawiooctanu.
O35796	Białko p32 (c1qbp)	Endogenny inhibitor megakanalu mitochondrialnego (MPTP).

8.7.2 Weryfikacja oddziaływań PKC β II z potencjalnymi białkowymi partnerami mitochondrialnymi

Technika koimmunoprecypitacji posłużyła do potwierdzenia oddziaływań między PKC β II a białkami wytypowanymi metodą chromatografii powinowactwa i spektrometrii mas. Do doświadczenia użyto frakcji mitochondrialnej wyizolowanej z części CA2-4, DG hipokampa po jednej godzinie od przywrócenia krążenia po 5 minutowej ischemii i przeciwciała anti-PKC β II. Kompleksy białkowe związane z PKC β II poddawano rozdzielni elektroforetycznemu SDS-PAGE i analizie western blot dla konkretnego białka (Tabela 7).

Tabela 7 Zdjęcia western blot obrazujące wyniki koimmunoprecypitacji wybranych białek mitochondrialnych z PKC β II w regionie CA2-4, DG wyizolowanych po 1 godzinie reperfuzji od 5 minutowego niedokrwienia mózgu myszokoczka (p. str. 45).



MT- frakcja mitochondrialna, IP-immunoprecypitat, białka współwystępujące z PKC β II

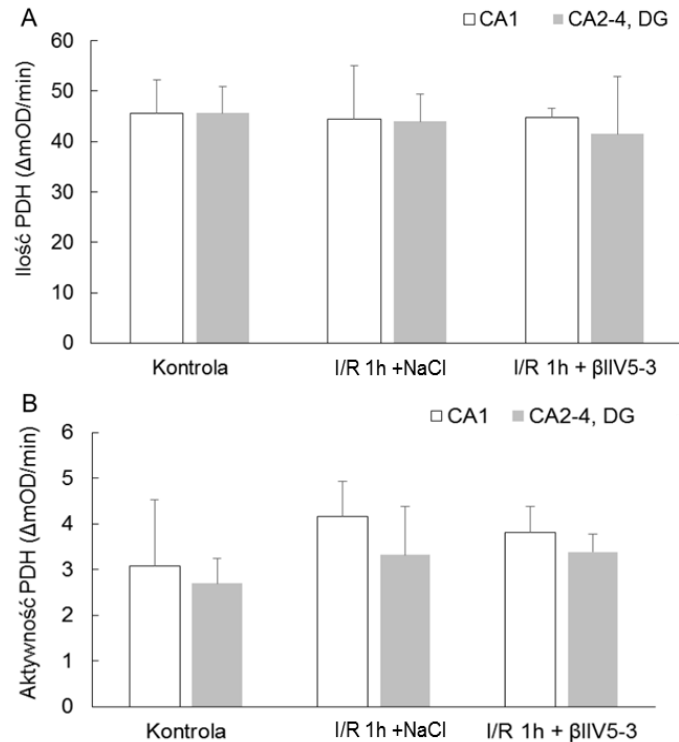
Tak skonstruowane doświadczenie miało wskazać czy rzeczywiście w wyniku I/R dochodzi do oddziaływania badanej PKC β II z wytypowanymi na wcześniejszym etapie białkami mitochondrialnymi. W 9 na 10 przypadków uzyskano potwierdzenie oddziaływania danego białka z PKC β II.

8.7.3 Wpływ PKC β II na aktywność wybranych białek mitochondrialnych

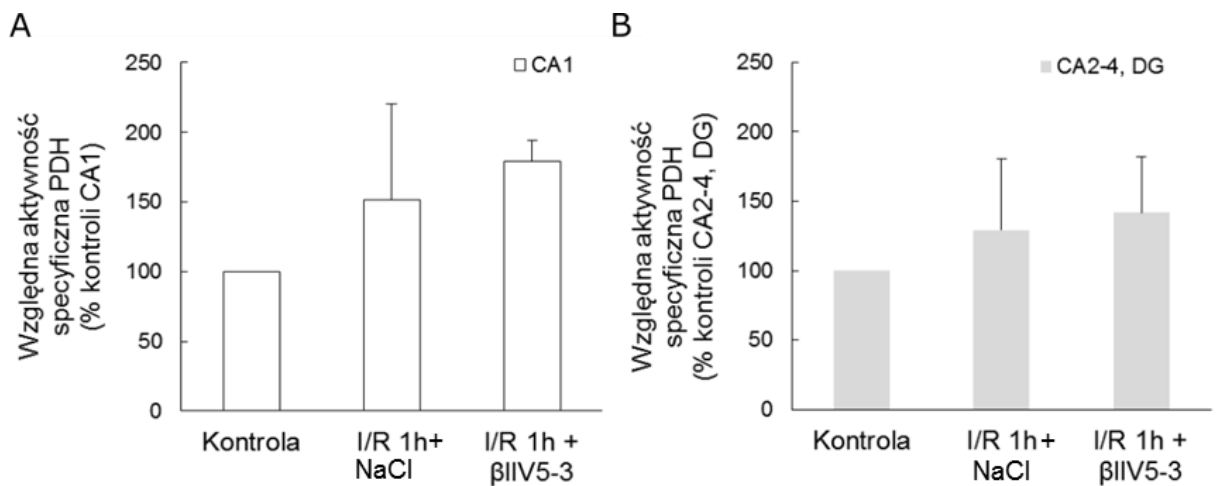
W celu zweryfikowania hipotezy mówiącej, że PKC β II translokowana do mitochondriów po epizodzie ischemicznym moduluje aktywność enzymatyczną białek, przez co wpływa na los komórki, zbadano wpływ inhibitora PKC β II (β IIV5-3) na aktywność dehydrogenazy pirogronianowej (PDH) i syntazy ATP. Z listy białek utworzonej w badaniach chromatografii powinowactwa i spektrometrii mas wybrano powyższe enzymy ze względu na ich istotne miejsce w metabolizmie energetycznym. Równoległe z pomiarem aktywności badano względne zmiany ilości dehydrogenazy pirogronianowej i syntazy ATP. Do doświadczeń użyto trzech grup zwierząt: kontrolnych, poddanych ischemii i reperfuzji (I/R 1h + NaCl) oraz takiej, której dodatkowo podano inhibitor β IIV5-3 (I/R 1h + β IIV5-3). Pomiary aktywności wykonano za pomocą zestawów firmy Abcam.

8.7.4 Pomiar względnej ilości i aktywności dehydrogenazy pirogronianowej

Ilość dehydrogenazy pirogronianowej (PDH) nie różniła się ani między regionami hipokampa, ani między grupami eksperymentalnymi (Ryc. 20 A). Podobnie nie obserwowano statystycznie istotnych różnic w jej aktywności (Ryc. 20 B). Zahamowanie translokacji PKC β II do mitochondriów w próbie I/R 1h + NaCl nie miało wpływu na zmiany w aktywności dehydrogenazy pirogronianowej. Dodatkowo obliczono względną aktywność specyficzną PDH dla każdego z regionów hipokampa (aktywność PDH/ ilość PDH). Jak widać na Ryc. 21 epizod ischemiczno-reperfuzyjny nie zwiększa w sposób istotnie statystyczny aktywności dehydrogenazy zarówno w CA1 jak i w CA2-4, DG w porównaniu do kontroli. Dodanie inhibitora β IIV5-3 nie miało wpływu na zmiany aktywności dehydrogenazy pirogronianowej w CA1, czy CA2-4, DG (Ryc. 21), co sugeruje brak wpływu PKC β II na przebieg reakcji katalizowanej przez PDH w badanych warunkach.



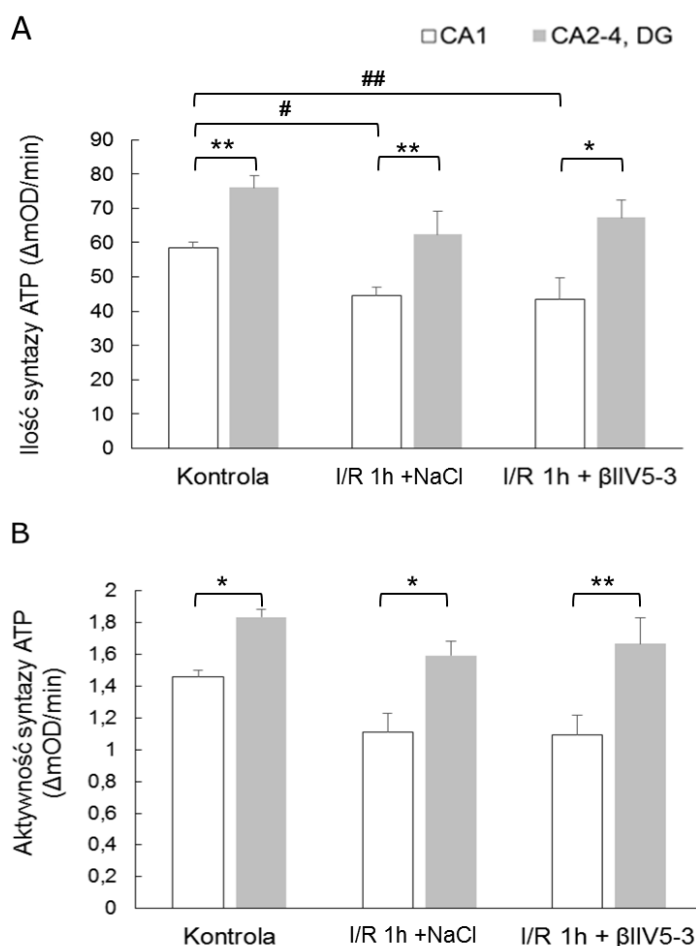
Ryc. 20 Ilość (A) i aktywność (B) dehydrogenazy pirogronianowej (PDH) wyizolowanej z CA1 i CA2-4, DG hipokampów otrzymanych ze zwierząt kontrolnych oraz poddanych 5 minutowej ischemii i 1h reperfuzji I/R (I/R 1h + NaCl) oraz po zastosowaniu inhibitora PKC β II (I/R 1h + β IIV5-3). Wartości są wyrażone jako Δ mOD/min ($n=3$).



Ryc. 21 Względna aktywność specyficzna PDH mierzona w próbach wyizolowanych z CA1 (A) i CA2-4, DG (B) po ischemii i reperfuzji (I/R 1h + NaCl) oraz po zastosowaniu inhibitora PKC β II (I/R 1h + β IIV5-3). Wartości są wyrażone jako procent kontroli, $n=3$.

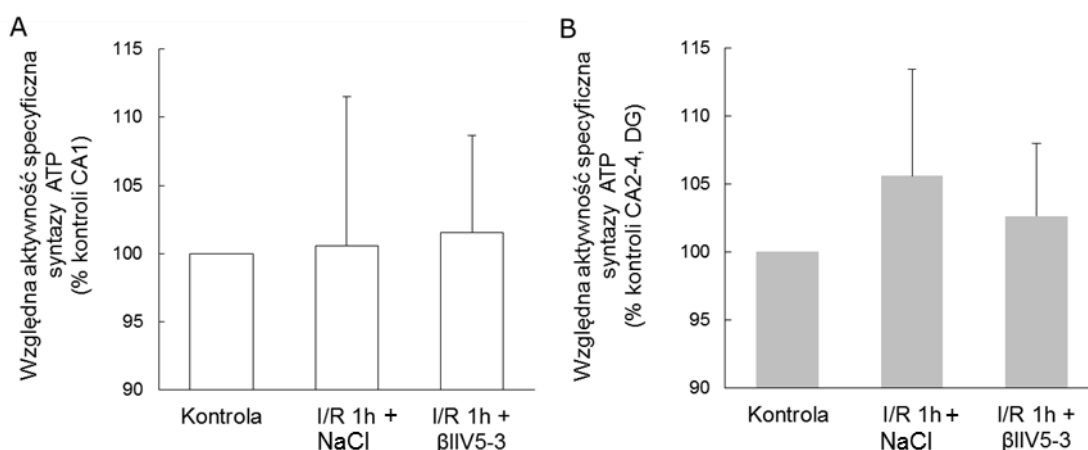
8.7.4.1 Pomiar względnej ilości i aktywności mitochondrialnej ATP-azy (syntazy ATP)

Innymi białkami oddziałującymi z PKC β II w mitochondriach CA2-4, DG po I/R 1h są podjednostki α i β syntazy ATP (p. str. 66-67). Ilość syntazy ATP (domeny F1) już w kontroli, różniła się istotnie między regionami hipokampa - w części CA1 hipokampa obserwowano jej mniej niż w CA2-4, DG (Ryc. 22). Zależność ta widoczna była również w grupie I/R 1h + NaCl oraz I/R 1h + β IIV5-3. Ponadto odnotowano mniejszą ilość syntazy ATP w próbach wyizolowanych po ischemii oraz po podaniu inhibitora w porównaniu do kontroli w regionie CA1. Podobnie obserwowano istotne różnice dotyczące aktywności syntazy ATP między porównywanymi regionami hipokampa (Ryc. 22).



Ryc. 22 Ilość (A) i aktywność (B) syntazy ATP wyizolowanej z CA1 i CA2-4, DG hipokampów po jednej godzinie od ischemii (I/R 1h + NaCl) oraz po zastosowaniu inhibitora (I/R 1h + β IIV5-3). Wartości są wyrażone jako Δ mOD/min (n=3). * p <0,05 CA1 vs CA2-4, DG, ** p <0,01 CA1 vs CA2-4, DG, # p <0,05 I/R 1h CA1 vs kontrola CA1, ## p <0,01 I/R 1h + β IIV5-3 CA1 vs kontrola CA1.

Wydaje się, że niższe wartości aktywności syntazy ATP w CA1 (w porównaniu do CA2-4, DG) odzwierciedlają jej mniejszą ilość w tym regionie. Nie zaobserwowano istotnie statystycznych zmian w aktywności syntazy po epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym lub po podaniu inhibitora PKC β II w porównaniu do grup kontrolnych w badanych warunkach reakcji. W przypadku względnej specyficznej aktywności syntazy ATP (liczonej jako aktywność syntazy ATP dzielonej przez ilość syntazy ATP), gdzie każdy z regionów hipokampa rozpatrywany jest osobno, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Podanie inhibitora β IIV5-3 nie zmieniło zdolności katalitycznej syntazy ATP (Ryc. 23).

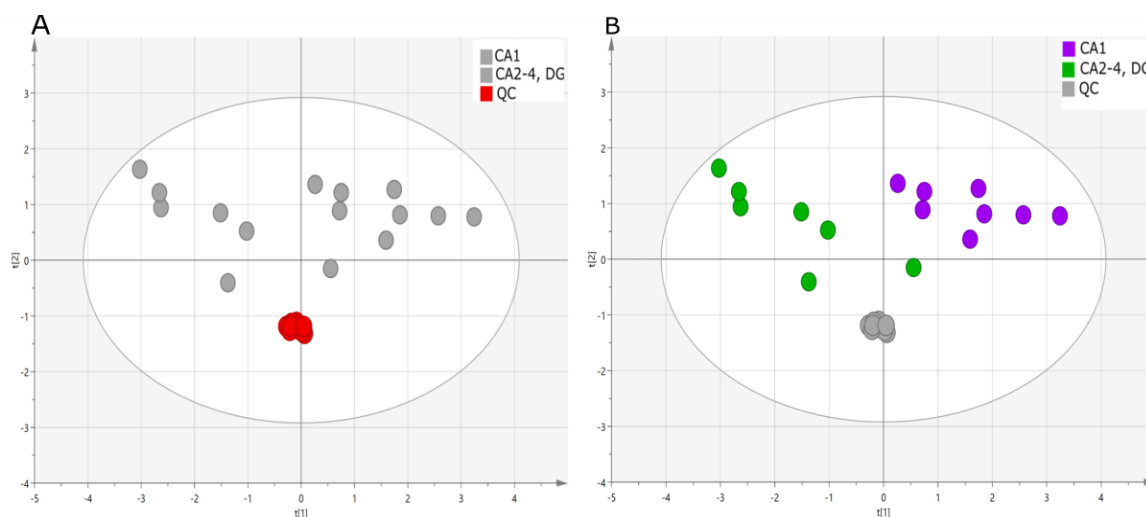


Ryc. 23 Względna aktywność specyficzna syntazy ATP mierzona w próbach wyizolowanych z CA1 (A) i CA2-4, DG (B) po ischemii i reperfuzji (I/R 1h +NaCl) oraz po zastosowaniu inhibitora (I/R 1h + β IIV5-3). Wartości są wyrażone jako procent kontroli.

8.8 Opis mitochondrialnego metabolomu

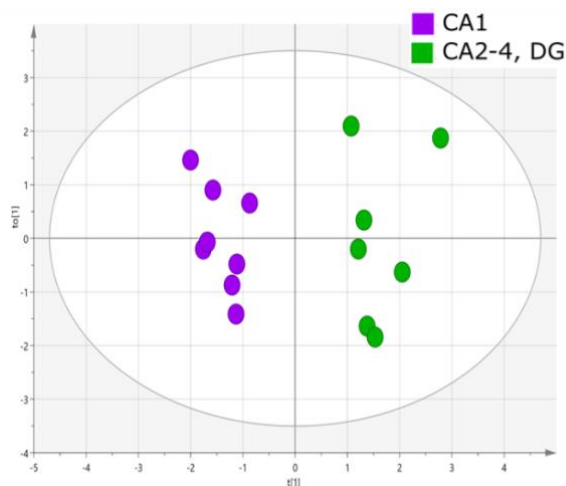
Analizy metabolomiczne wykonano w celu zbadania wpływu I/R oraz inhibitora PKC β II (β IIV5-3) na profil metabolitów w mitochondriach regionu CA1 i CA2-4, DG hipokampa. W niecelowanych analizach metabolomicznych z wykorzystaniem techniki GC-MS zidentyfikowano 43 metabolity w próbach mitochondrialnych wyizolowanych z hipokampa myszokoczka. Dane uzyskane ze wszystkich prób badanych (kontrola, I/R+NaCl, I/R+ β IIV5-3 z regionów CA1 i CA2-4, DG hipokampa) zostały poddane wielowymiarowemu modelowaniu statystycznemu (p. str. 50-51). Nienadzorowana analiza czynników głównych (PCA) służąca do pokazania powiązań między zmiennymi wykazała prawidłowość przebiegu procesu analitycznego, co jest widoczne na wykresie (Ryc. 24 A) jako skupienie prób kontrolnych (QC). Świadczy to o stabilności systemu podczas rozdzielania i detekcji oraz o wiarygodności analizy instrumentalnej. Ponadto, w analizie PCA zauważyć można separację prób (Ryc. 24 B), widoczną jako umiejscowienie dwóch grup obserwacji (CA1, CA2-4, DG) po obu stronach linii oznaczonej „t[1]”, czyli pierwszej głównej

składowej. Składowa główna jest liniową kombinacją badanych zmiennych i umożliwia obserwację różnic między grupami. Można zatem założyć, że obserwowany rozdział prób wynika prawdopodobnie z odmiennego profilu metabolitów jakie występują pomiędzy dwoma regionami hipokampa: CA1 oraz CA2-4, DG (Ryc. 24 B). Jednocześnie nie zaobserwowano wyników odbiegających (ang. *outliers*) od obserwacji (test Hotelling's T²) oraz innych niepożądanych trendów.



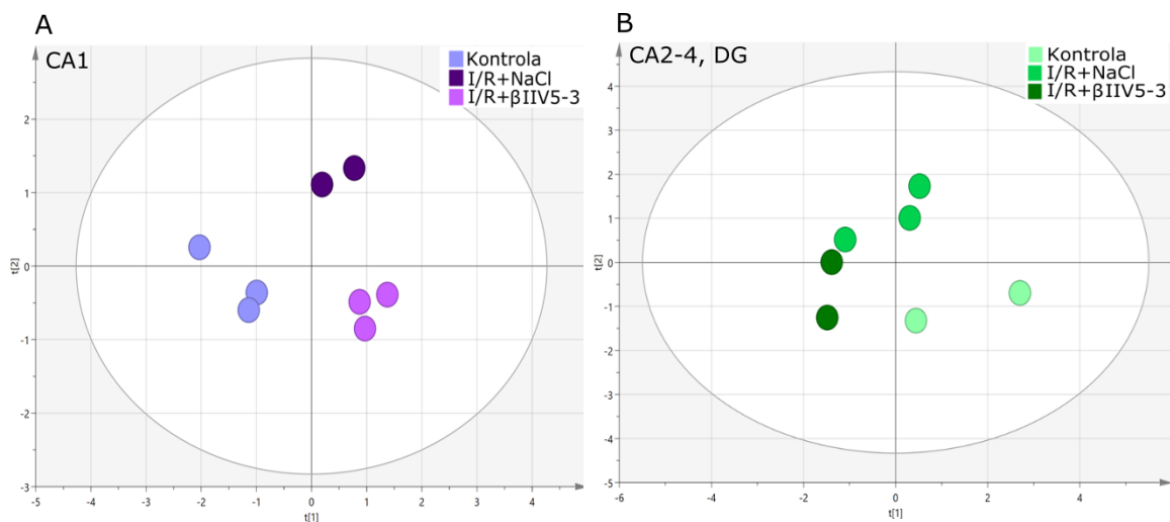
Ryc. 24 Wizualizacja analizy czynników głównych (PCA) dla wyników analizy GC-MS. (A) Skupienie punktów reprezentujących próby QC (czerwone oznaczenia) świadczy o bardzo dobrej jakości przebiegu analiz. Szarym kolorem oznaczono próby badane. (B) Rozdział prób badanych ze względu na region hipokampa, z którego zostały wyizolowane. Fioletowe oznaczenia – próby mitochondrialne z CA1, zielone – próby mitochondrialne z CA2-4, DG. $R^2 = 0,752$, $Q^2 = 0,278$

W celu ewaluacji wyników analizy PCA zastosowano ortogonalną metodę częściowych największych kwadratów (OPLS). W metodzie tej uwzględniono przynależność prób do danej grupy badanej (CA1 i CA2-4, DG). Na rycinie 25 widoczny jest wyraźny rozdział grup ze względu na region hipokampa, co potwierdziło obserwację widoczną w PCA.



Ryc. 25 Wizualizacja analizy ortogonalnej częściowych największych kwadratów (OPLS) dla wyników analizy GC-MS pokazująca rozdział prób badanych ze względu na region hipokampa. $R^2= 0,557$; $Q^2= 0,75$

Dodatkowo dla każdego z badanych regionów hipokampa wykonano analizę częściowych największych kwadratów (PLS), w której wskazano przynależność prób do grup badanych (Ryc. 26). Dzięki użyciu tej metody zauważono, że wyizolowane z CA1 próby grupują się razem tworząc trzy niezależne skupienia punktów odpowiadające trzem grupom badanim (kontrola, I/R 1h + NaCl, I/R 1h + β IIV5-3). Dla regionu CA2-4, DG punkty reprezentujące badane grupy są bardziej rozproszone, co świadczy o tym, że różnice pomiędzy grupami badanymi nie są aż tak wyraźne jak w przypadku regionu CA1.



Ryc. 26 Wizualizacja analizy częściowych największych kwadratów (PLS) dla wyników analizy GC-MS. (A) Próby mitochondrialne z CA1, $R^2= 0,482$; $Q^2= 0,305$ (B) próby mitochondrialne z CA2-4, DG, $R^2= 0,739$; $Q^2= 0,309$

Dane, otrzymane dzięki narzędziom statystyki wielowymiarowej, sugerują, że widoczne różnice między próbami wynikają z odmiennego profilu metabolitów między regionami hipokampa (analiza PCA Ryc. 24, OPLS Ryc. 25) oraz między grupami badanymi (PLS Ryc. 26).

W celu zbadania co powoduje rozdział prób z regionów hipokampa o różnej wrażliwości na niedokrwienie, CA1 i CA2-4, DG (obserwowany na Ryc. 25), w pierwszej kolejności przeanalizowano widma masowe z prób kontrolnych w celu identyfikacji poszczególnych metabolitów (Tabela 8). Wykazano, że istnieją substancje, których ilości² różnią się w zależności od części hipokampa, z którego zostały wyekstrahowane. Zidentyfikowane metabolity należą do różnych klas związków organicznych takich jak: aminokwasy, kwasy karboksylowe wraz z kwasami tłuszczowymi czy pochodne puryn. W Tabeli 8 za pomocą proporcji (średnia wartość intensywności sygnału MS w próbce kontrolnej z CA2-4, DG/ średnia wartość intensywności sygnału MS w próbce kontrolnej z CA1) ilości danego związku wskazano metabolity dominujące w regionie CA2-4, DG (2,20-1,21) lub CA1 (0,88-0,53) oraz metabolity o jednakowej ilości w obu regionach (1,17-0,94). W ten sposób uzyskano prawdopodobny profil metaboliczny (biochemiczny „odcisk palca”) regionów CA1 i CA2-4, DG w próbach kontrolnych (Tabela 8).

Tabela 8 Zawartość metabolitów w mitochondriach wyizolowanych z regionów CA1 i CA2-4, DG hipokampów z grupy kontrolnej. Dane zostały przedstawione z uwzględnieniem różnic zaobserwowanych pomiędzy strukturami hipokampa.

Nazwa metabolitu	Średnia wartość intensywności sygnału MS		Proporcja CA2-4, DG/CA1
	CA1	CA2-4, DG	
α -tokoferol	16691,1223	36786,59036	2,20
Fenylalanina	9172,609065	19036,12461	2,08
Leucyna	76046,79341	136244,0252	1,79
Hipoksantyna	5832,810363	10318,9689	1,77
Glicerol	193673,714	326872,1139	1,69
Tyrozyna	11154,68634	18132,68056	1,63
Walina	22174,85747	34651,21324	1,56
Izoleucyna	13337,00385	20764,34461	1,56
Kwas fumarowy	6547,465303	10113,63346	1,54
Kwas asparaginianowy	132842,2575	192906,7412	1,45
Kwas etyloheksanowy	4745,587483	6839,952065	1,44
Kwas dehydroaskorbinowy	3105,091816	4206,228616	1,35
Kreatynina	29233,48813	38029,82895	1,30
Treonina	8605,393138	11075,05854	1,29

² W metodzie GC-MS nie oznaczano stężenia metabolitów. Względą miarą ilości zidentyfikowanych związków jest intensywność sygnału, czyli liczebność jonów danej cząsteczki wykrytych w detektorze MS.

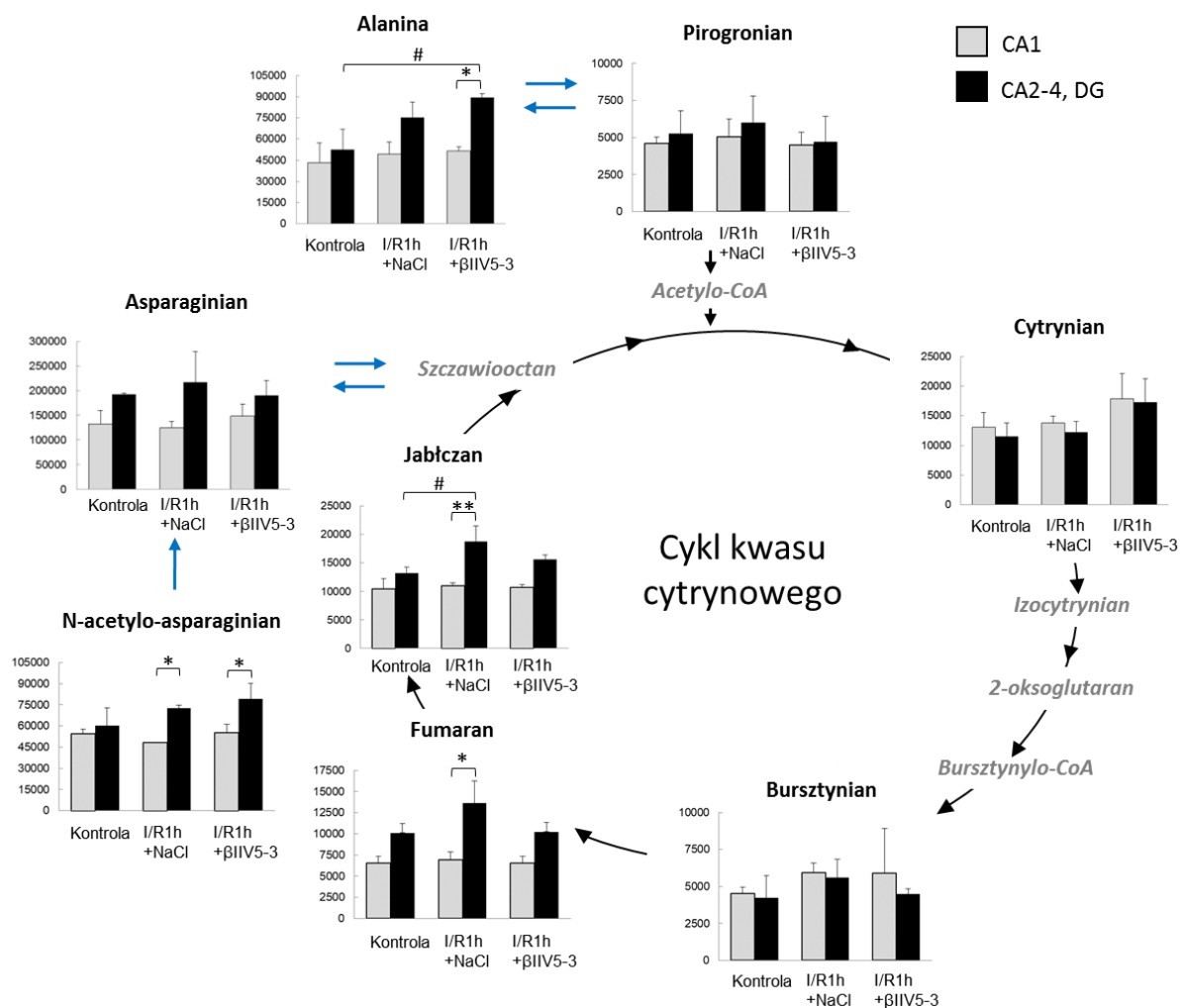
Nazwa metabolitu	Średnia wartość intensywności sygnału MS		Proporcja CA2-4, DG/CA1
	CA1	CA2-4, DG	
Seryna	32194,22092	41149,29567	1,28
Kwas jabłkowy	10430,0898	13184,53378	1,26
Kwas nonanowy	16662,15387	21057,41571	1,26
Kwas arachidonowy	9986,860696	12586,72999	1,26
Kwas mlekowy	102018,2745	128087,618	1,26
Alanina	43404,25388	52363,24058	1,21
Kwas glicerynowy	3323,592996	3903,195651	1,17
Rybozo-5-fosforan	14795,83684	16993,54675	1,15
Kwas pirogronowy	4608,60437	5268,506833	1,14
Kwas fosforowy	1676845,301	1869919,813	1,12
Kwas N-acetylo-L-asparaginowy	54321,19902	60087,0629	1,11
Prolina	5563,080936	5974,780292	1,07
Cholesterol	1339279,698	1393795,187	1,04
Kwas glutaminowy	168517,2083	170268,6462	1,01
Kwas piroglutaminowy	74730,59991	73000,10363	0,98
Inozyno-5'-monofosforan	5369,501952	5192,11212	0,97
Adenozyno-5'-monofosforan	24091,03128	23063,70327	0,96
Kwas oleinowy	29942,28008	28144,84717	0,94
Kwas bursztynowy	4525,016668	4240,682469	0,94
Myo-inozytol	179155,6907	158246,502	0,88
Kwas cytrynowy	13111,70095	11494,23215	0,88
Kwas palmitynowy	321567,1519	276093,1336	0,86
Kwas mirystynowy	12774,26454	10785,05661	0,84
Kwas stearynowy	365758,4812	304308,5937	0,83
Glicerolo-3-fosforan	5819,796369	4822,045428	0,83
Mocznik	18775,43432	13579,85849	0,72
Hydroksymocznik	1485,495522	972,2220456	0,65
Pirofosforan	36931,69531	22796,88683	0,62
Glicyna	32014,94424	19597,70767	0,61
Glukoza	574356,9902	320549,4199	0,56
Monostearynian glicerolu	113869,2677	60035,60249	0,53

Legenda

2,5	Kolory zawarte w tabeli korespondują z ilością danego metabolitu w regionie CA2-4, DG. Im większa ilość tym skala jest bardziej czerwona, im niższa – tym komórka z wartością jest bardziej ciemnozielona.
1,75	
1,5	
1,25	
1	
0,75	
0,5	
0,25	

Analogicznie do prób kontrolnych, opisano profil metaboliczny dla grupy ischemicznej (I/R 1h + NaCl) oraz dla tej, w której zwierzętom bezpośrednio po niedokrwieniu mózgu podawano inhibitor PKC β II (1/R 1h + β IIV5-3). Analiza wykazała, że zarówno I/R jak i inhibitor powodują zmiany w ilości zidentyfikowanych metabolitów. Dodatkowo, wśród obserwowanych zmian metabolitów poszukiwano związku z mitochondrialnymi białkami zidentyfikowanymi jako partnerzy PKC β II. Z racji tego, że PKC β II może oddziaływać z dehydrogenazą pirogronianową i karboksylazą pirogronianową (p. str. 66-67), skupiono się na analizie metabolitów związanych z przemianami pirogronianu (cytrynian, bursztynian, fumaran, jabłczan, alanina, asparaginian).

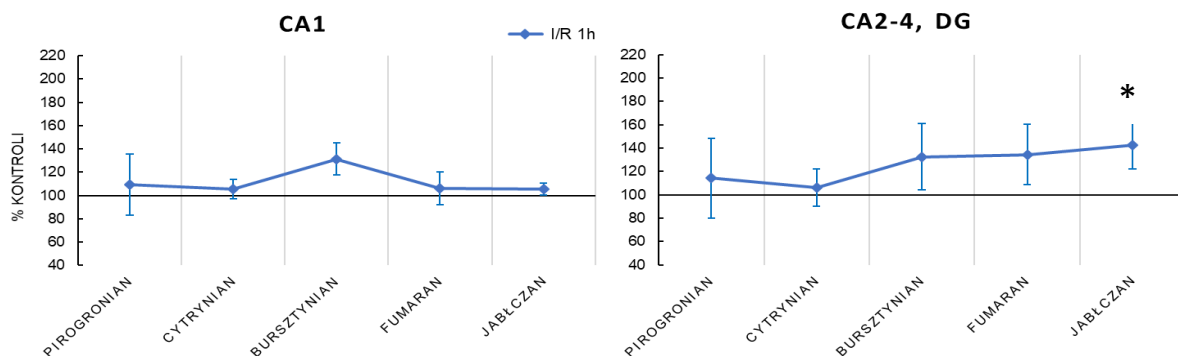
W analizie metabolomicznej, nie odnotowano istotnie statystycznych zmian w ilości pirogronianu, cytrynianu i bursztynianu w mitochondriach (Ryc. 27) – ani między regionami hipokampa, ani grupami badanymi. Ilości fumaranu i jabłczanu po jednogodzinnej reperfuzji były większe w mitochondriach regionu CA2-4, DG w porównaniu do CA1. Ponadto, ilość jabłczanu w mitochondriach regionu CA2-4, DG odnotowana po I/R była istotnie większa od wartości kontrolnej. Po podaniu inhibitora β IIV5-3 ilości fumaranu i jabłczanu w obu regionach były zbliżone do ilości obserwowanych w grupie kontrolnej.



Ryc. 27 Ilości wybranych metabolitów wyrażone jako średnie wartości intensywności sygnału mierzonego metodą GC-MS. Kursywą zaznaczone są związki, które nie zostały zidentyfikowane w analizie GC-MS. Wartości są wyrażone jako średnia liczebność jonów danej cząsteczki \pm SD, (n=3), * $p < 0,05$ I/R 1h +NaCl CA2-4, DG vs I/R 1h + NaCl CA1 oraz I/R 1h + β IIV5-3 CA2-4, DG vs I/R 1h + β IIV5-3 CA1; ** $p < 0,01$ I/R 1h +NaCl CA2-4, DG vs I/R 1h +NaCl CA1, # $p < 0,05$ I/R 1h +NaCl CA2-4, DG vs kontrola CA2-4, DG oraz I/R 1h + β IIV5-3 CA2-4, DG vs kontrola CA2-4, DG.

Chcąc lepiej zrozumieć otrzymane wyniki zastosowano dodatkowy sposób wizualizacji danych – tzw. wykresy crossover. Kolejne związki pośrednie danego szlaku metabolicznego (tu pirogronian i substraty cyklu kwasu cytrynowego) są zaprezentowane na osi odciętych. Ilość badanych związków jest wyrażona na osi rzędnych jako procent wartości kontrolnych. Taki sposób przedstawienia wyników umożliwia prześledzenie zmian w procesie metabolicznym w porównaniu do kontroli (przedstawionej na wykresie jako linia pozioma o wartości 100%) i jest znany w badaniach metabolizmu (Norberg i Siesjo 1974, Folbergrova i wsp. 1974, Yang i wsp. 2006).

Na podstawie wykresów crossover (Ryc. 28) wydaje się, że biochemiczne odpowiedzi mitochondriów po godzinnej reperfuzji, widoczne jako zmiany ilości metabolitów, są odmienne w każdym z badanych regionów hipokampa.

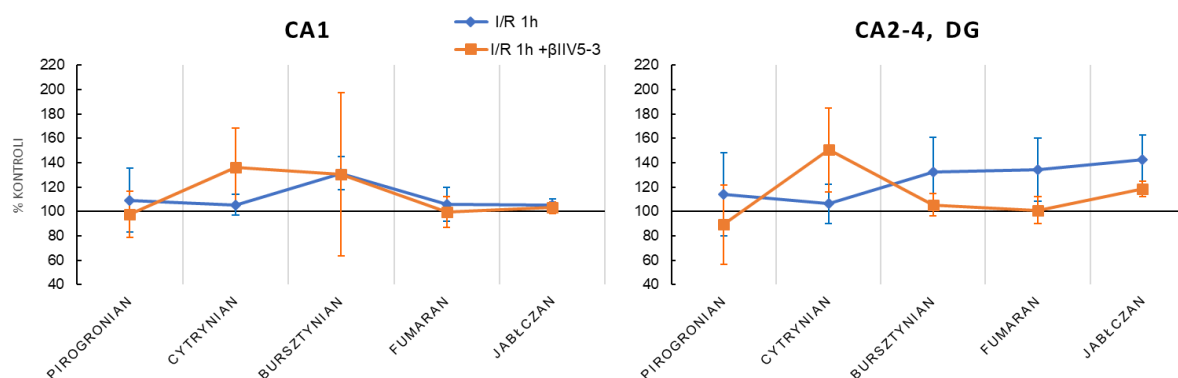


Ryc. 28 Zawartość metabolitów cyklu kwasu cytrynowego w mitochondriach regionów CA1 i CA2-4, DG hipokampa po jednogodzinnej reperfuzji (I/R 1h + NaCl). Wartości są wyrażone jako procent kontroli \pm SD, $n=3$, * $p<0,05$ I/R 1h CA2-4, DG vs kontrola.

Podanie inhibitora β IIV5-3 bezpośrednio po I/R nie wpłynęło istotnie na zmiany ilości metabolitów w regionie CA1 hipokampa w porównaniu do grupy kontrolnej czy poddanej ischemii i reperfuzji (Ryc. 29). Oprócz cytrynianu, ilości pirogronianu, bursztynianu, fumaranu i jabłczanu nie uległy zmianie w stosunku do I/R.

Natomiast w mitochondriach CA2-4, DG po podaniu inhibitora, obserwowano tendencję wskazującą na odmienny charakter zmian w porównaniu do I/R.

Ponadto, porównując wykresy (CA1 i CA2-4, DG) zmian metabolitów po podaniu inhibitora β IIV5-3 można zasugerować, że w obu regionach hipokampa tendencje w zmianach ilości pirogronianu, cytrynianu, fumaranu i jabłczanu są podobne.



Ryc. 29 Porównanie zawartości metabolitów cyklu kwasu cytrynowego w mitochondriach regionów CA1 i CA2-4, DG hipokampa po jednogodzinnej reperfuzji (I/R 1h + NaCl) i po podaniu inhibitora (I/R 1h + β IIV5-3). Wartości są wyrażone jako procent kontroli \pm SD, $n=3$.

Oprócz związków pośrednich cyklu kwasu cytrynowego, metodą GC-MS zidentyfikowano metabolity (alanina, asparaginian), które potencjalnie mogą dostarczać substraty do cyklu. Reakcja transaminacji alaniny i 2-oksoglutaranu (zgodnie z równaniem 1) może być dodatkowym źródłem pirogronianu.

Równanie 1



Po podaniu inhibitora β IIV5-3 zaobserwowano większą statystycznie ilość alaniny w mitochondriach regionu CA2-4, DG w porównaniu do CA1 (Ryc. 27). Obserwacja ta może sugerować przesunięcie równowagi reakcji transaminacji w kierunku syntezy alaniny w regionie CA2-4, DG.

Natomiast ilość asparaginianu nie różni się istotnie statystycznie między badanymi grupami. Jednak ilości N-acetylo-asparaginianu (Ryc. 27), z którego może powstawać asparaginian, są większe w mitochondriach regionu CA2-4, DG niż w CA1 zarówno w grupie poddanej I/R + NaCl jak i w grupie poddanej I/R + NaCl oraz działaniu inhibitora β IIV5-3.

9. Dyskusja

Przedstawiony projekt jest kontynuacją badań prowadzonych w Pracowni Biologii Molekularnej IMDiK PAN dotyczących poznania roli różnych izoform kinaz białkowych C (PKC) w procesach prowadzących do poischemicznej eliminacji neuronów oraz w endogennej neuroprotekcji. W niniejszej pracy zaprezentowano udział zlokalizowanej w mitochondriach kinazy białkowej C β II w endogennym procesie neuroprotekcijnym uruchamianym po krótkotrwałym epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym mózgu myszokoczka mongolskiego.

Badania wykazały, że PKC β II jest białkiem, którego immunoreaktywność zwiększa się po epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym mózgu (I/R) wyłącznie w mitochondriach części hipokampa odpornej na niedokrwienie (CA2-4, DG), co sugeruje udział tej kinazy w procesach adaptacyjnych chroniących komórki nerwowe tego regionu. Stąd celem przedstawianej pracy było: zweryfikowanie hipotezy o neuroprotekcijnym działaniu izoformy PKC β II wewnątrz mitochondriów oraz poznanie mitochondrialnego mechanizmu działania tej kinazy prowadzącego do przeżycia komórek nerwowych w regionie CA2-4, DG hipokampa po krótkotrwałym epizodzie niedokrwienym mózgu. Przypuszczono, że ochronne działanie PKC β II może polegać na jej translokacji/aktywacji w mitochondriach, co wiązałoby się z uruchomieniem procesów neuroprotekcyjnych. Dlatego też, skupiono się na poznaniu jej mitochondrialnych partnerów białkowych oraz poszukiwaniu mitochondrialnych różnic metabolicznych między badanymi regionami hipokampa, które wskazywałyby na ścieżkę modulowaną przez PKC β II.

W chwili rozpoczęcia opisanych w tej rozprawie badań, istniały doniesienia o szkodliwym wpływie zahamowania aktywności PKC β na komórki nerwowe w modelach prekondukcjonowania ischemicznego mózgu myszy (Bu i wsp. 2011) i uszkodzenia ekscytotoksycznego w skrawkach hipokampa szczura (Kowalczyk i wsp. 2012). Wyniki te stały się przesłankami sugerującymi ochronne działanie PKC β w mózgu. Doświadczenia zaprezentowane w tej pracy dowodzą, że z dwóch izoform PKC β to PKC β II może mieć udział w endogennej neuroprotekcji w modelu całkowitego, krótkotrwałego niedokrwienia mózgu myszokoczka mongolskiego.

9.1 PKC β II a mitochondria

W poniższym projekcie metodą western blot wykazano obecność PKC β we frakcjach mitochondrialnych otrzymanych w różnych czasach po I/R (1 i 96 godz.) z obu regionów hipokampa myszokoczka. Występowanie PKC β w mitochondriach zaobserwowano po raz

pierwszy w komórkach Müllera siatkówki oka karpia (Fernández i wsp. 1995) oraz później w mózgu myszy (Bu i wsp. 2011) i myszokoczka (Kowalczyk i wsp. 2012).

Wyniki przedstawione w tej rozprawie, oprócz detekcji PKC β w mitochondriach hipokampa wykazują, że po I/R immunoreaktywność tej kinazy zwiększa się głównie w części hipokampa mało wrażliwej na niedokrwienie – CA2-4, DG (patrz str. 52, Ryc. 9), co jest spójne z wynikami uzyskanymi wcześniej w naszej pracowni (Kowalczyk i wsp. 2009, 2012). W celu rozstrzygnięcia czy odnotowany przyrost sygnału dotyczy obu izoform PKC β , czy też tylko jednej z nich, przeprowadzono dodatkowe testy dla każdego z enzymów. Uzyskane wyniki (str. 53, Ryc. 10) wskazują, że to izoforma β II jest tą, której immunoreaktywność zwiększa się po I/R w regionie CA2-4, DG hipokampa. Szczególne zainteresowanie wzbudza fakt, że wzmocnienie immunoreaktywności PKC β II w mitochondriach jest widoczne już jedną godzinę po niedokrwieniu. Obserwacja ta może świadczyć o udziale tej kinazy we wczesnej odpowiedzi komórek na sygnał ischemiczno-reperfuzyjny. Bazując na danych literaturowych wykluczono możliwość syntezy PKC β II *de novo*, ponieważ wskutek krótkotrwałej ischemii (tj. 3-5 min) obserwuje się zablokowanie syntezy białek w całym hipokampie myszokoczka. Dopiero po dłuższym czasie od momentu reperfuzji (5-48 godz. dla CA1; \geq 1,5 godz. dla CA2-4, DG) obserwuje się stopniowe przywrócenie czynności aparatu translacyjnego komórki (Thilmann i wsp. 1986, Araki i wsp. 1990). W związku z tym wykonano doświadczenia mające na celu potwierdzenie koncepcji poischemicznego przemieszczenia się PKC β II do mitochondriów. Jak wspomniano we wstępie, przemieszczenie się PKC w odpowiedzi na bodziec, np. sygnał ischemiczny, z cytoplazmy do obszarów związanych z błonami jest zjawiskiem powszechnym (Wolf i wsp. 1985, Zablocka i wsp. 2001, Churchill i Szweda 2005, Parton i Simons 2007, Qi i Mochly-Rosen 2008, Kowalczyk i wsp. 2009). W celu zweryfikowania hipotezy o translokacji PKC β II jako elementu mechanizmu neuroprotekcijnego, zastosowano peptyd β IIV5-3, który jest selektywnym inhibitorem tego procesu. Technika mikroskopii elektronowej posłużyła do wyznakowania kinazy bezpośrednio w tkance. Większa ilość PKC β II była widoczna w mitochondriach hipokampa po I/R w porównaniu do kontroli, natomiast zastosowanie inhibitora β IIV5-3 spowodowało zahamowanie translokacji PKC β II do wnętrza mitochondriów. Obserwacje mikroskopowe były spójne z wynikami western blot. Zmniejszenie immunoreaktywności po użyciu peptydowego inhibitora potwierdziło założenie, że poischemiczne wzmocnienie sygnału PKC β II obserwowane we frakcji mitochondrialnej związane jest z jej translokacją z cytoplazmy do mitochondriów (str. 55-56 Ryc. 12). Jak wspomniano, translokacja PKC do różnych przedziałów komórki jest charakterystyczną właściwością tych enzymów. Docelowy przedział komórkowy danej izoformy może

determinować mechanizm jej działania oraz substraty czy partnerów, z którymi może oddziaływać. W przypadku przemieszczenia się PKC do mitochondriów mówi się zazwyczaj o dwóch konsekwencjach tego zjawiska: o przeżyciu lub śmierci komórek. Znane są doniesienia o translokacji PKC ϵ do mitochondriów w modelach prekondycjonowania ischemicznego mózgu i serca, która wspomaga rozwój tolerancji na niedokrwienie i w obliczu stresu ischemiczno-reperfuzyjnego działa ochronnie na komórki, dzięki oddziaływaniu z białkami mitochondrialnymi. Postulowane działanie PKC ϵ obejmuje m.in. regulację aktywności i translokacji białek antyapoptotycznych, np. Bcl-2 (Lu i wsp. 2007) oraz proapoptotycznych, np. Bid do mitochondriów (Sivaprasad i wsp. 2007). Zwiększenie ilości PKC ϵ w mitochondriach poprzez użycie specyficznego aktywatora translokacji tej kinazy wzmacnia oddychanie komórkowe, zwiększa poziom fosforylacji białek łańcucha transportu elektronów (Dave i wsp. 2008), zmniejsza produkcję reaktywnych form tlenu i pobudza detoksykację aldehydów (Sun i wsp. 2013). Z kolei przemieszczenie się PKC δ do mitochondriów w odpowiedzi na reperfuzję związane jest z uruchomieniem procesów prowadzących do apoptozy i/lub nekrozy komórek. Uważa się, że powoduje ona zmiany w przekazywaniu sygnału wapniowego, wraz z H₂O₂ znosi potencjał błonowy, umożliwia wypływ cytochromu c i aktywację kaspazy 3 (Majumder i wsp. 2000). Przytoczone obserwacje wskazują na to, że nie sama aktywność PKC, lecz również ich translokacja jest elementem procesów decydujących o dalszych losach komórek.

W następnym etapie prezentowanych tu badań dowiedziono, że po 1 godzinie od ischemii PKC β II może przebywać w macierzy mitochondrialnej. Istnieją izoformy PKC, które wykrywano w mitochondriach w mózgu po I/R – ϵ , δ , α , γ , μ (Kowalczyk i wsp. 2009), lecz nie wykazano ich dokładnej lokalizacji wewnątrz tych organelli. W przypadku PKC ϵ określono jej położenie jako „związane” z wewnętrzną błoną mitochondrialną (Budasz i wsp. 2010). Analiza sekwencji aminokwasowej PKC β II wykazała, że nie zawiera ona klasycznej presekwencji kierującej do mitochondriów (p. str 57-58). Wynik ten może sugerować, że ta kinaza może być wyposażona w nietypową sekwencję kierującą lub podlega innemu mechanizmowi przemieszczania do mitochondriów niż białka zawierające taką sekwencję. PKC ϵ również nie zawiera sekwencji aminokwasowej kierującej do mitochondriów, ale jej import do tych organelli jest możliwy dzięki oddziaływaniu z białkiem opiekuńczym Hsp90 oraz kompleksem TOM (Budasz i wsp. 2010). Natomiast PKC δ przemieszcza się do mitochondriów niezależnie od aktywności Hsp90 (Budasz i wsp. 2010). W komórce istnieją jeszcze inne białka opiekuńcze m.in. Hsp70, Hsc70 i Hsp40 (Young i wsp. 2003, Bhangoo i wsp. 2007), które pośredniczą w transporcie białek do mitochondriów. Dlatego możliwe jest, że pozostałe PKC są transportowane w inny sposób niż PKC ϵ . Istnieją doniesienia o oddziaływaniu PKC β II z Hsp70 i Hsp90, lecz nie w kontekście

mitochondrialnego importu a dojrzewania i stabilizacji cząsteczki PKC β II (Gould i wsp. 2009) oraz zapobiegania zmniejszenia liczby dojrzałych (ufosforylowanych w trzech miejscach regulatorowych i pozostających w stanie autoinhibicji) form białka PKC β II w cytoplazmie (Gao i Newton 2002, 2006, Stahelin 2014). Zatem dalsze badania są niezbędne, aby wyjaśnić mechanizm poischemicznego przemieszczania się PKC β II do mitochondriów hipokampa.

9.2 PKC β II a neuroprotekcja

Chcąc odpowiedzieć na pytanie, czy aktywność PKC β II wewnątrz mitochondriów pomaga komórkom nerwowym przeżyć w regionie CA2-4, DG hipokampa, po uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym przeprowadzono szereg doświadczeń, w których używano inhibitorów PKC β II. W rozdziale Wyniki (str. 60-62) pokazano, że zahamowanie aktywności enzymatycznej PKC β II powoduje pogłębienie uszkodzenia pierwotnie wywołanego przez NMDA w skrawkach hipokampa szczura. Wyniki te potwierdziły rezultaty otrzymane przez Kowalczyk i wsp. (2012). Do doświadczenia użyto inhibitora PKC β (257879-35-9), który współzawodniczy z ATP o centrum aktywne. Tanaka i wsp. (2004) wykazali, że posiada on 60-krotnie większe powinowactwo do PKC β niż wobec izoform α , ϵ i γ przy $IC_{50} = 5\text{nM}$. Inhibitor został zaklasyfikowany przez Anastassiadis i wsp. (2011) jako drugi najbardziej selektywny inhibitor PKC z 7 badanych, ale równocześnie wykazano, że może on hamować inne kinazy, np. JAK3, FLT3, czy RSK. Inna grupa badawcza potwierdziła, że inhibitor opisany przez Tanakę i współpracowników (2004) hamuje kinazę janusową JAK3 (McDonnell i wsp. 2014). Wyniki te poddają w wątpliwość selektywność inhibitora 257879-35-9 zastosowanego przeze mnie w hodowli skrawków hipokampa *in vitro*. Niemożliwym zatem jest oszacowanie, czy otrzymane wyniki – zwiększone uszkodzenie tkanki są skutkiem zahamowania jedynie PKC β II, czy również innych kinaz. W celu rozstrzygnięcia wątpliwości co do roli PKC β II w neuroprotekcji wykorzystano selektywny peptydowy inhibitor (β IIV5-3), przy pomocy którego zahamowano przemieszczanie się PKC β II do mitochondriów, a tym samym jej aktywność wewnątrz tych organelli. Wskutek tego działania doszło do wzmocnienia uszkodzenia w modelu *in vitro* - ekscytotoksycznym modelu uszkodzenia skrawków hipokampa szczura (str. 62 Ryc. 17) i *in vivo* - krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu myszokoczka (str. 62-64 Ryc. 18 i 19). Na tej podstawie można sugerować, że do przeżycia komórek po I/R mózgu potrzebna jest aktywna PKC β II znajdująca się wewnątrz mitochondriów. Nie można jednak wykluczyć, że na efekt nasilenia uszkodzenia wpłynęło też zahamowanie translokacji PKC β II do innych przedziałów komórkowych, co nie było badane w tej pracy. Tak jak opisano wcześniej w rozdziale Materiały i Metody (str. 34-35), inhibitor β IIV5-3 jest peptydem uniemożliwiającym oddziaływanie izoformy

PKC β II z białkiem RACK1. Sekwencja aminokwasowa β IIV5-3 jest charakterystyczna tylko dla PKC β II i dzięki temu ma selektywne działanie wobec tej izoformy (Stebbins i Mochly-Rosen 2001). Tego typu peptydy używano z powodzeniem w badaniach nad udziałem PKC ϵ i δ w modelach chorób układu sercowo-naczyniowego (Churchill i wsp. 2009, Palaniyandi i wsp. 2009). Służyły one do potwierdzenia hipotez o korzystnym (PKC ϵ) lub szkodliwym (PKC δ) efekcie translokacji tych kinaz do mitochondriów. Ponadto peptydowy inhibitor PKC δ pomyślnie przeszedł badania kliniczne II fazy u pacjentów z ostrym zawałem serca (Bates i wsp. 2008), co sugeruje wysoką specyficzność inhibitorów tego typu.

W literaturze można znaleźć liczne doniesienia o poischemicznej translokacji/aktywacji kinaz białkowych C, co może mieć związek z rolą PKC w odpowiedzi komórki na sygnał niedokrwienny (Harada i wsp. 1999, Zabłocka i wsp. 2001, Matsumoto i wsp. 2004, Kowalczyk i wsp. 2009, Dave i wsp. 2011). Wśród mechanizmów działania PKC badanych w modelach ischemicznego prekondycjonowania można wyróżnić wcześniej wspomnianą neuroprotekcijną fosforylację białek mitochondrialnych przez PKC ϵ (Budasz i wsp. 2010), jednak pewne izoformy PKC bywają szkodliwe dla komórek. Przykładem jest izoforma γ , która może prowadzić do śmierci komórek poprzez oddziaływanie z receptorem NMDA podczas ischemii (Chakravarthy i wsp. 1998, MacDonald i wsp. 2001), powodując niekontrolowany napływ jonów wapnia do komórek (Arundine i Tymianski 2004). Natomiast brak PKC γ u myszy genetycznie zmodyfikowanych powoduje zwiększenie uszkodzenia w trakcie reperfuzji, sugerując tym samym korzystne działanie tej kinazy w okresie po przywróceniu krążenia (Aronowski i wsp. 2000). PKC ζ pośredniczy w uszkodzeniu wywołanym przez NMDA w hodowli neuronów pierwotnych, a jej hamowanie poprawia stan komórek (Koponen i wsp. 2003).

Zaangażowanie PKC β w ochronę komórek nerwowych zostało poznane w modelach hartowania ischemicznego mózgu myszy (Bu i wsp. 2011, Liu i wsp. 2005, Niu i wsp. 2005, Yang i wsp. 2016) i uszkodzenia wywołanego przez OGD (Wang i wsp. 2004). Ponadto sugeruje się, że PKC β może uczestniczyć w procesach neuroprotekcyjnych i regeneracyjnych w niektórych narządach zmysłów. Przypuszcza się, że PKC β II chroni komórki włoskowate wewnątrz narządu Cortiego ze względu na jej udział w przekaźnictwie nerwowym i utrzymaniu homeostazy jonowej w uchu wewnętrznym (Ladrech i wsp. 2007). Co więcej, istotność roli jaką pełni ona w narządzie słuchu podkreśla fakt, że mutacja zmiany sensu w genie kodującym PKC β segreguje z utratą słuchu w zakresie niskich częstotliwości w rzadkiej chorobie Ménière'a (Martín-Sierra i wsp. 2016). Natomiast w komórkach siatkówki wyizolowanych z uszkodzonego nerwu wzrokowego, użycie aktywatorów PKC β powoduje wzmożony wzrost zakończeń nerwowych (Wu i wsp. 2003). Na podstawie przedstawionych przeze mnie wyników można wnioskować, że PKC β II wydaje się

być zaangażowana w procesy neuroprotekcyjne, natomiast w badaniach skutków niedokrwienia innych narządów np. serca, jelit czy płuc przypisuje się jej szkodliwą rolę (Ferreira i wsp. 2011a, Fujita i wsp. 2004, Wang i wsp. 2014). Kontrastujące ze sobą funkcje, mogą być związane z plejotropowym charakterem PKC β II, rozumianym jako zależność sposobu jej działania od narządu lub rodzaju tkanki, w której występuje (Mochly-Rosen i wsp. 2012). Ponadto, podobnie jak w przypadku PKC δ , na funkcjonowanie PKC β II może mieć wpływ sytuacja panująca w danym momencie w komórce, czyli etap aktywacji PKC, jej stopień ufosforylowania, komórkowa lokalizacja, a także stan ścieżek przekazywania sygnału i białek docelowych (Basu i Pal 2010). Zatem wydaje się, że sposób działania PKC β II jest zależny od sumy czynników istniejących w komórce danego rodzaju i powinno się unikać bezpośredniej ekstrapolacji wyników doświadczeń.

Na podstawie obserwacji własnych wydaje się, że translokacja PKC β II do mitochondriów jest czynnikiem prowadzącym do cytoprotekcji po krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu myszokoczek w obszarze CA2-4, DG hipokampa.

9.3 Mechanizm działania PKC β II

Dotychczasowa wiedza nie daje precyzyjnej odpowiedzi na pytanie w jaki sposób PKC β II może chronić komórki nerwowe przed uszkodzeniem ischemiczno-reperfuzyjnym. Poznanie mechanizmu działania tej kinazy na drodze mitochondrialnej stało się drugim głównym celem powyższej pracy doktorskiej.

W pierwszym etapie badań mechanizmu działania PKC β II po poischemicznej translokacji do mitochondriów postanowiono sprawdzić jej aktywność. Wykazano, że PKC β II, wyizolowana z frakcji mitochondrialnej w krótkim i długim czasie po przywróceniu krążenia (I/R 1h i 96h) jest zdolna do fosforylacji substratu (str. 59). Oznacza to, że wewnątrz tych organelli jest ona aktywna, bądź zostaje aktywowana i może przyłączać reszty fosforanowe do białek mitochondrialnych. Uzyskany wynik jest zgodny z obserwacjami przeprowadzonymi dla PKC ϵ . Po translokacji do mitochondriów, kinaza ta fosforyluje białka mitochondrialne (mitoK_{ATP}, oksydazę cytochromową), powodując zmiany w ich funkcjonowaniu prowadzące do ochrony komórek nerwowych przed szkodliwymi skutkami epizodu ischemiczno-reperfuzyjnego (Sun i wsp. 2013). W świetle uzyskanych wyników można sugerować, że PKC β II, podobnie jak PKC ϵ , fosforyluje białka mitochondrialne, przez co zmienia ich aktywność w taki sposób, który umożliwia przeżycie komórkom nerwowym części CA2-4, DG hipokampa po I/R mózgu.

Chcąc poznać kolejne etapy działania PKC β II, zidentyfikowano białka mitochondrialne mogące oddziaływać z tą kinazą. Dziesięć zidentyfikowanych białek przeanalizowano metodą koimmunoprecypitacji i potwierdzono oddziaływanie dziesięciu z nich z endogenną PKC β II

wyzolowaną z CA2-4, DG po jednej godzinie od ischemii. Ze względu na funkcje, białka te można podzielić na: enzymy związane z cyklem Krebsa, łańcuchem transportu elektronów, metabolizmem aminokwasów oraz białka transportowe. Poniżej przedstawiono każde ze zidentyfikowanych białek w kontekście modulowania ich funkcji przez PKC β II.

9.3.1 Dehydrogenaza pirogronianowa

Podjednostka E1 β , będąca potencjalnym poischemicznym partnerem PKC β II, to enzym należący do kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDH). Katalizuje on pierwszy etap reakcji dekarboksylacji pirogronianu do acetylo-CoA, który ogranicza szybkość całego kompleksu (Patel i Korotchkina 2006). Dwie podjednostki β wraz z podjednostkami α tworzą heterotetramer (2 β , 2 α) zawierający centrum katalityczne (Nelson i Cox 2008). Regulacja całego kompleksu PDH polega, oprócz oddziaływań allosterycznych, na fosforylacji i defosforylacji reszt serynowych na podjednostkach E1 α (Patel i Korotchkina 2006). Fosforylacja jest równoznaczna z dezaktywacją PDH, a usunięcie grup fosforanowych prowadzi do aktywacji enzymu (Strumiło 2005). Dane literaturowe podają informacje o hamującym wpływie PKC δ na PDH w modelu I/R serca. Translokacja PKC δ do mitochondriów w okresie reperfuzji skutkuje aktywacją kinazy dehydrogenazy pirogronianowej 2 (PDK2) prowadzącą do fosforylacji podjednostki E1 α i w efekcie inhibicją PDH (Churchill i wsp. 2005). Zahamowanie oddziaływania PKC δ i PDK2 podczas reperfuzji powoduje zmniejszenie uszkodzenia serca (Qvit i wsp. 2016). Podjednostka E1 β dehydrogenazy pirogronianowej została już wcześniej zidentyfikowana jako białko oddziałujące z PKC β II w korze mózgu myszy (Bu i wsp. 2011), ale nie poznano biologicznej funkcji tego oddziaływania.

Test aktywności enzymatycznej endogennej PDH posłużył do poznania efektu biologicznego interakcji PKC β II z PDH. Wykonane tu doświadczenia wskazują, że podanie inhibitora β IIV5-3 nie zmienia ilości czy aktywności dehydrogenazy pirogronianowej wyizolowanej z hipokampa po 1h od I/R w stosunku do kontroli (p. str. 67-68, grupa badana I/R 1h + β IIV5-3), co sugeruje brak wpływu PKC β II na PDH w zastosowanych warunkach doświadczenia. Podczas izolacji PDH zastosowano zalecenia producenta, które miały umożliwić zachowanie endogennej fosforylacji i aktywności PDH. Co oznacza, że pomiar był pozbawiony artefaktów wynikających ze sposobu przygotowania próbki, np. zmian aktywności wynikających ze spontanicznej defosforylacji PDH. Dodatkowo zaobserwowano, że aktywność PDH w próbach wyizolowanych zarówno z CA1, jak i z CA2-4, DG po jednej godzinie od epizodu ischemicznego nie zmienia się istotnie w porównaniu do kontroli (p. str. 67-68, grupa badana I/R 1h). Obserwacje te są niezgodne z doniesieniami o zmniejszeniu aktywności PDH po

krótkotrwałej ischemii (10-15 min) i reperfuzji w modelach ogniskowego niedokrwienia mózgu - MCAO u szczurów (Lundgren i wsp. 1990), całkowitego niedokrwienia mózgu szczura - BCCA (Cardell i wsp. 1989), niedokrwienia mózgu wywołanego zatrzymaniem akcji serca u psów (Bogaert i wsp. 1994), lecz nie są zupełnie odosobnione. Inne zespoły badawcze obserwowały w krótkim czasie reperfuzji brak zmian w aktywności PDH lub wręcz jej przyrost w modelach: 30-minutowego niedokrwienia mózgu szczura (4VO) z 1-godziną reperfuzją (Zaidan i Sims 1993), całkowitego niedokrwienia mózgu u myszokoczka mongolskiego, w którym ischemia trwała 5 minut lub godzinę, a krążenie przywracano odpowiednio na godzinę oraz 20-minut (Katayama i wsp. 1997, Fukuchi i wsp. 1998). Co ciekawe Katayama i wsp. (1998) w modelu 1-godzinnego niedokrwienia mózgu myszokoczka odnotowali po 20 minutach reperfuzji większą aktywność PDH niż w kontroli, a po 1 i 2 godzinach wartość aktywności była mniejsza niż kontrolna. Przypuszcza się, że brak zmian w aktywności może być związany ze zmniejszeniem proporcji [ATP]/[ADP], co uniemożliwia zahamowanie PDH przez jej kinazę (Zaidan i Sims 1993, Fukuchi i wsp. 1998). Dodatkowo, jony Ca^{2+} , które napłynęły do komórki w czasie ischemii i we wczesnej fazie reperfuzji nie zostały jeszcze usunięte i mogą aktywować fosfatazę PDH, która katalizuje aktywację PDH (Katayama i wsp. 1997, Fukuchi i wsp. 1998).

Należy również wziąć pod uwagę ograniczenia wynikające z użytego tu testu. Pomiary dotyczyły jedynie jednego punktu czasowego po I/R – jednej godziny. Badanie prób z innych punktów czasowych po ischemii mogłoby dostarczyć dodatkowych danych. Zaidan i Sims (1993) dopiero po 3 godz. od reperfuzji obserwowali obniżenie aktywności PDH w regionie wrażliwym na niedokrwienie mózgu – grzbietowo-bocznym prążkowie. Ponadto, warto zwrócić uwagę na to, że kompleks dehydrogenazy stanowią trzy części wykazujące aktywność enzymatyczną (E1, E2, E3). W przeprowadzonym teście badano przyrost końcowego produktu - NADH, który powstaje dzięki zaistnieniu wszystkich trzech reakcji. Zaidan i wsp. (1998) dowiedli, że zmiany w aktywności jednej części PDH są mierzalne dopiero gdy zahamuje się dwie pozostałe. W celu uzyskania bardziej szczegółowych wyników należałoby powtórzyć doświadczenie uzupełniając je o dodatkowe próby uzyskane w innych czasach po reperfuzji i w miarę możliwości zmodyfikować metodykę tak, żeby móc przeprowadzić pomiar aktywności każdej z podjednostek E osobno.

9.3.2 Mitochondrialna ATP-aza (syntaza ATP)

Mitochondrialna syntaza ATP (tzw. kompleks V) katalizuje utworzenie ATP z ADP i Pi (odwrócenie reakcji hydrolizy) wykorzystując siłę protonomotoryczną powstałą dzięki przepływowi elektronów przez łańcuch oddechowy. Stanowi ona kompleks białkowy składający

się z części F_1 (podjednostki 3α , 3β , δ , ϵ , γ) o aktywności katalitycznej syntazy i F_0 (podjednostki 10-14 c, a) zawierającej kanał protonowy. Podjednostki α i β są homologami, obie wiążą nukleotydy, ale tylko β jest zaangażowana w katalizę (Berg i wsp. 2009). Opisano, że oddziaływanie PKC α z syntazą ATP przeciwdziała zmniejszeniu liczby podjednostek γ w komórkach kanalika proksymalnego nerek poddanych hipoksji, powoduje zwiększenie fosforylacji podjednostek α , β , γ oraz wspomaga odzyskanie aktywności syntazy po uszkodzeniu hipoksyjnym (Nowak i Bakajsova 2015). Odmienny charakter interakcji reprezentuje PKC δ , która oddziałuje z podjednostką d syntazy ATP (nie fosforylując jej) i hamuje jej aktywność w kardiomiocytach (Nguyen i wsp. 2008, Sugawara i wsp. 2013). Zastosowanie inhibitora oddziaływania PKC δ -podjednostka d syntazy ATP działa ochronnie na serce poddane ischemii i reperfuzji (Nguyen i wsp. 2010). Oddziaływanie podjednostek α i β syntazy ATP z PKC β I i PKC β II było już opisane wcześniej, ale dotychczas nie poznano ich funkcjonalnego znaczenia (Kowalczyk i wsp. 2012, Bu i wsp. 2011).

Do opisu aktywności syntazy ATP użyto powszechnie stosowanego pomiaru aktywności hydrolitycznej tego enzymu, który obrazuje wydajność reakcji katalizowanej przez wyizolowany enzym. Nie zaobserwowano istotnego wpływu PKC β II, ani I/R (1 godz.) na ilość oraz aktywność hydrolityczną syntazy ATP. Natomiast wykazano, że w części CA1 jest jej istotnie mniej niż w obszarze CA2-4, DG, co ma odzwierciedlenie w jej aktywności w obu regionach (p. str. 69-70). W korze mózgu myszokoczka ilość ATP wraca do wartości bliskich kontrolnym po ok. 30 minutach od 5- i 30-minutowego niedokrwienia mózgu (Lust i wsp. 1985, Almeida i wsp. 1995), co może sugerować przywrócenie funkcji syntazy ATP w krótkim okresie reperfuzji. Obserwowany w tej pracy brak różnic w aktywności syntazy ATP, może być związany z wznowieniem prawidłowego działania syntazy po jednej godzinie od reperfuzji. Z drugiej strony, ilość i aktywność syntazy ATP różni się pomiędzy rejonami hipokampa w mózgu kontrolnego myszokoczka, co może sugerować niejednakową zdolność mitochondriów do syntezy ATP w warunkach stresu ischemicznego i krótkiego (1 godzina) czasu reperfuzji. Powtórzenie pomiaru aktywności syntazy ATP z wykorzystaniem prób wyizolowanych w krótszych niż 1 godzina czasach po przywróceniu krążenia mogłoby dostarczyć dodatkowych informacji na temat wpływu PKC β II na działanie kompleksu V w trakcie wczesnej odpowiedzi na bodziec ischemiczno-reperfuzyjny.

9.3.3 Karboksylaza pirogronianowa

Karboksylaza pirogronianowa (PC) katalizuje reakcję utworzenia szczawiooctanu na drodze przyłączenia CO_2 do pirogronianu. W mózgu jest reakcją dopełniającą cykl Krebsa (Patel i

wsp. 1974) zachodzącą głównie w astrocytach (Shank i wsp. 1985) i jest niezbędna do syntezy *de novo* neuroprzekaźników aminokwasowych (McKenna i wsp. 2012). Aktywność PC jest obniżona w modelu uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego u osesków szczura (Brekke i wsp. 2014) i niewykrywalna w obszarze uszkodzenia w modelu I/R mózgu u dorosłych szczurów (Håberg i wsp. 1998, 2006). W momencie powstawania tej pracy nie znaleziono doniesień literaturowych o oddziaływaniu karboksylazy pirogronianowej z jakąkolwiek izoformą PKC.

9.3.4 Glutaminaza typu nerkowego

Glutaminaza katalizuje reakcję hydrolizy wiązania amidowego glutaminy, w wyniku której powstaje glutaminian i jon amonowy. Wraz z syntetazą glutaminy jest elementem cyklu glutamina-glutaminian, którego prawidłowe funkcjonowanie zapewnia neutralizację jonów amonowych (Sidoryk 2004, Márquez i wsp. 2013). W modelu ogniskowego niedokrwienia mózgu szczura aktywność glutaminazy w ognisku udaru jest niewykrywalna, ale zostaje ona zachowana w czasie 24 i 48 godzin po niedokrwieniu w obszarze penumbry. Wyniki te mogą sugerować związek między jej obecnością w tym regionie a zwiększonym stężeniem glutaminianu i opóźnioną śmiercią komórek (Newcomb i wsp. 1998). PKC ϵ zwiększa aktywność glutaminazy poprzez fosforylację, co prowadzi do wzmożonego przekształcania glutaminy w glutaminian (Han i wsp. 2018), który w komórkach nowotworowych jest zużywany do utworzenia prekursorów reakcji dopełniających cykl Krebsa i stanowi źródło NADPH. Zjawisko to wydaje się być metabolicznym dostosowaniem komórek nowotworowych. Ponadto utrzymywanie takich dodatkowych zasobów energetycznych jest pożądane w warunkach transformacji nowotworowej ponieważ sprzyja szybkiemu wzrostowi komórek nowotworowych i procesom powstawania przerzutów (DeBerardinis i wsp. 2008, Han i wsp. 2018). W obliczu wyników o ufosforylowanej, aktywniejszej glutaminazie dostarczającej substraty energetyczne (Han i wsp. 2018) można spekulować czy w obszarze penumbry dochodzi rzeczywiście do uszkodzenia na drodze dalszej produkcji glutaminianu, czy też może ma miejsce próba uratowania komórek poprzez zasilenie ich dodatkowymi źródłami energii. Rozważania tego tematu wymagają dalszych badań.

9.3.5 Wahadła mitochondrialne

Wahadła jablczanowo-asparaginianowe oraz glicerofosforanowe odpowiadają za transport równoważników redukcyjnych z cytoplazmy do mitochondriów. Są to procesy niezbędne do utrzymania odpowiednich proporcji NAD⁺/NADH wymaganych do tlenowego metabolizmu glukozy i syntezy neuroprzekaźników w mózgu (McKenna i wsp. 2006). Elementem wahadła jablczanowo-asparaginianowego, występującego głównie w neuronach, jest transporter

jablczan/2-oksoglutaran (Slc25a11) wytypowany w badaniach proteomicznych jako białko oddziałujące z PKC β II. Dotychczas wykazano, że PKC ϵ oddziałuje z Slc25a11 w sercu (Edmondson i wsp. 2002), ale nie poznano funkcjonalnego znaczenia tego zjawiska.

Wahadło glicerolo-3-fosforanu (GPD2) również służy do przenoszenia elektronów z cytoplazmatycznego NADH do mitochondriów. W jego działanie zaangażowane są dwie dehydrogenazy glicerolo-3-fosforanu – mitochondrialna i cytoplazmatyczna. Moje badania wykazały, że mitochondrialna dehydrogenaza jest białkiem będącym potencjalnym partnerem/substratem PKC β II. Dehydrogenaza ta katalizuje utlenienie glicerolo-3-fosforanu do fosfodihydroksyacetonu, w efekcie prowadząc do przeniesienia elektronów z glicerolo-3-fosforanu na FAD, a następnie na koenzym Q w łańcuchu oddechowym (Berg i wsp. 2009). W literaturze brak wzmianek o oddziaływaniu GPD2 z PKC.

9.3.6 Kompleks I łańcucha transportu elektronów

Podjednostka 75 kDa wraz z 44 innymi białkami tworzy kompleks I mitochondrialnego łańcucha oddechowego ssaków. Jest to największe białko kompleksu, które zawiera centrum żelazowo-siarkowe oraz aktywność dehydrogenazy NADH. Jego funkcją jest odbiór elektronów z NADH i włączenie ich do łańcucha oddechowego. Zmniejszenie liczby podjednostek 75 kDa i 24 kDa obserwowano w mózgach pacjentów cierpiących na zespół Downa i chorobę Alzheimera (Kim i wsp. 2001). Wydaje się, że niewystarczająca liczba podjednostek kompleksu I powoduje nieprawidłowe funkcjonowanie łańcucha oddechowego, zwiększenie stresu oksydacyjnego i w efekcie może prowadzić do śmierci komórek nerwowych (Kim i wsp. 2001). W modelu całkowitego niedokrwienia mózgu obserwuje się obniżenie aktywności kompleksu I w mitochondriach wyizolowanych z hipokampa (Dave i wsp. 2001). Natomiast zastosowanie prekondukcjonowania ischemicznego w tym modelu umożliwia zachowanie funkcji kompleksów łańcucha oddechowego (Dave i wsp. 2001). Hamowanie aktywności kompleksu I w skrawkach hipokampa szczura powoduje uszkodzenie głównie w regionie CA1, co może mieć związek ze zjawiskiem wybiórczej wrażliwości neuronów hipokampalnych na bodziec ischemiczny (Xu i wsp. 2003). Nadekspresja PKC α w komórkach kanalika proksymalnego nerek poddanych hipoksji zwiększa aktywność kompleksu I i wspomaga regenerację ATP (Nowak i Bakajsova 2012). Regulacja funkcjonowania tych białek przez PKC α może odbywać się bezpośrednio – przez fosforylację podjednostek białkowych lub pośrednio – przez defosforylację białek mitochondrialnych dzięki oddziaływaniu PKC α na odpowiednią fosfatazę (Nowak i Bakajsova 2012). W literaturze nie znaleziono doniesień o bezpośrednim oddziaływaniu PKC z podjednostką 75 kDa kompleksu I.

9.3.7 Kompleks III łańcucha transportu elektronów

Białko Rieskego jest niezbędne dla aktywności enzymatycznej kompleksu cytochromu b-c1, tzw. kompleksu III łańcucha transportu elektronów. Przyłączając ubichinol przenosi ono elektrony na centrum żelazowo-siarkowe [2Fe-2S], a następnie na cytochrom c. Transport elektronów przez kompleks III jest sprzężony z translokacją protonów i tym samym przyczynia się do powstawania siły protonomotorycznej. W modelu epilepsji szczura obserwowano zmniejszenie ilości białka Rieskego w obszarze CA1 hipokampa, zaś zachowanie go w obszarach CA2 i CA3 łączono z neuroprotektynym działaniem (Junker i wsp. 2005). Jest to o tyle ciekawe, że uszkodzenia hipokampa obserwowane w epilepsji są bardzo podobne do tych występujących po niedokrwieniu mózgu. Wiadomo, że zmiany w hipokampie (tzw. ang. *hippocampal sclerosis*) powstałe w wyniku hipoksji lub niedokrwienia mogą prowadzić do rozwoju padaczki płata czołowego. Sugeruje się, że wybiórcza śmierć neuronów hipokampa może być zarówno przyczyną jak i skutkiem napadów padaczkowych (Michaelis 2012). Stąd też można przypuszczać, że zmiany ilości białka Rieskego obserwowane w regionach hipokampa o różnej wrażliwości w modelu epilepsji mogą być podobne w modelach niedokrwienia mózgu. Defosforylacja białka Rieskego wydaje się być związana z tworzeniem MPTP, jednak nie poznano mechanizmu tego procesu (He i Lemasters 2005). W literaturze nie znaleziono doniesień o oddziaływaniu białka Rieskego z PKC.

Każde z opisanych wyżej białek pełni istotną rolę w szlakach metabolicznych zachodzących w mitochondriach. Zmiany ilości niektórych z nich obserwowano u pacjentów, którzy ucierpieli z powodu udaru niedokrwinnego. W obszarach martwicy odnotowano mniejszą liczbę³ m.in. podjednostek E1 β dehydrogenazy pirogronianowej, α i β syntazy ATP, 75 kDa kompleksu I oraz transportera 2-oksoglutaran/jabłczan (Datta i wsp. 2013). W związku z przedstawionymi wynikami wydaje się, że poischemiczne oddziaływania zidentyfikowanych białek mitochondrialnych z PKC β II mogą mieć istotne znaczenie dla dalszych losów komórek nerwowych. Możliwe jest, że prowadzą one do ufosforylowania białek, zmian ich konformacji, a tym samym do ich odmiennego działania. Być może modyfikacje aktywności białek mitochondrialnych modulowane przez PKC β II w obszarze hipokampa mało wrażliwym na niedokrwienie (CA2-4, DG) umożliwiają przeżycie komórek nerwowych po krótkotrwałym epizodzie niedokrwinnym mózgu myszokoczka.

³ W porównaniu do tych samych obszarów mózgu pacjentów, którzy umarli śmiercią naturalną.

9.4 Metabolomiczne „odciski palca” mitochondriów hipokampa

Przeprowadzone badania metabolomiczne ujawniły profil niskocząsteczkowych metabolitów mitochondrialnych związanych z metabolizmem energetycznym. Już podczas wstępnej analizy danych otrzymanych metodą GC-MS uwidoczniły się różnice między wrażliwą na niedokrwienie częścią hipokampa – CA1 a częścią mniej podatną – CA2-4, DG (str. 71-72, Ryc. 24). Identyfikacja otrzymanych widm masowych dla próbek kontrolnych umożliwiła poznanie konkretnych związków w mitochondriach, których ilość w warunkach fizjologicznych różni się w obu regionach hipokampa (str. 73-74, Tabela 9). Należą do nich m.in. przeciwutleniacze (α - tokoferol, kwas dehydroaskorbinowy), aminokwasy (Phe, Leu, Tyr, Val, Ile, Gly), kwasy tłuszczowe (stearynowy, palmitynowy, mirystynowy). Już w latach 80 XX w. były podejmowane próby scharakteryzowania regionów hipokampa myszokoczka o różnej wrażliwości (CA1 i CA3) na niedokrwienie przez pryzmat różnej zawartości wybranych metabolitów w tkance (Arai i wsp. 1986, Yasumoto i wsp. 1988). W związku z tym, że w cytowanych badaniach nie odnotowano różnic w ilości metabolitów bezpośrednio związanych z metabolizmem energetycznym (tj. fosfokreatyny i ATP) w regionach CA1 i CA3 w próbach kontrolnych, stwierdzono, że dopiero pojawienie się bodźca uszkodzającego prowadzi do zmian profilu metabolicznego tkanki (Arai i wsp. 1986). Zastosowane przez mnie podejście niecelowanych analiz metabolomicznych (próba identyfikacji wszystkich metabolitów w próbce) dało nowe spojrzenie na różnice w ilości związków niskocząsteczkowych w mitochondriach kontrolnych wyizolowanych z regionów CA1 i CA2-4, DG. Ze względu na to, że metabolizm mitochondriów i procesy metaboliczne zachodzące poza mitochondriami są ze sobą ściśle powiązane, wzajemnie uzależnione oraz często współregulowane, obserwowane różnice w zawartości metabolitów zidentyfikowanych we frakcji mitochondrialnej mogą odzwierciedlać biochemiczny profil komórek hipokampa regionów CA1 i CA2-4, DG w warunkach fizjologicznych. Niewątpliwie różnice te mogą przekładać się na różną wrażliwość tych regionów na uszkodzenie ischemiczno-reperfuzyjne. Obserwacje przedstawione w niniejszej rozprawie są w zgodzie z dawno wysuniętą hipotezą występowania w mózgu tzw. zjawiska patoklizy, które tłumaczy zróżnicowaną wrażliwość na czynnik uszkodzający odrębnymi właściwościami fizyczno-chemicznymi poszczególnych regionów mózgu (Schmidt-Kastner i Freund 1991). Jednak zrozumienie znaczenia zaobserwowanych różnic w ilości metabolitów z mitochondriów regionów CA1 i CA2-4, DG w warunkach fizjologicznych wymaga przeprowadzenia dalszych badań. Ponadto, analizując uzyskane wyniki trzeba mieć świadomość, że podobnie jak w przypadku wszystkich badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy materiałem doświadczalnym jest hipokamp, a zatem region mózgu niejednorodny pod względem

cytologicznym. To stwarza dodatkową trudność interpretacyjną podczas dyskusowania zmian metabolicznych w konkretnym typie komórek. Z drugiej strony, metabolizm neuronów i astrocytów są ze sobą ściśle związane, a zatem całościowe spojrzenie w kontekście zmian patologicznych w obrębie hipokampa w warunkach I/R zaproponowane w rozprawie, na tym etapie badań może mieć charakter informatywny.

Celem przeprowadzonej analizy metabolomicznej było zbadanie wpływu PKC β II na poischemiczny metabolom mitochondrialny w regionach hipokampa CA1 i CA2-4, DG. Opisano profil metabolitów związanych z metabolizmem energetycznym w badanych częściach hipokampa w warunkach kontrolnych, po epizodzie I/R i po podaniu inhibitora translokacji PKC β II. Zaobserwowane tendencje dotyczące zmian ilości metabolitów cyklu Krebsa (p. str. 75-77) sugerują, że mitochondria regionu CA2-4, DG hipokampa mogą reagować na stres I/R w odmienny sposób niż mitochondria z obszaru CA1. We frakcji mitochondrialnej wyizolowanej z CA2-4, DG po jednogodzinnej reperfuzji zauważono zwiększenie ilości fumaranu i jabłczanu (istotnie statystycznie w stosunku do CA1) przy braku obniżenia ilości cytrynianu (p. str. 75-77), co sugeruje przyhamowanie cyklu kwasu cytrynowego. Może być ono spowodowane przez zwiększenie proporcji NADH/NAD⁺, hamujące utlenienie jabłczanu do szczawiooctanu katalizowane przez dehydrogenazę jabłczanową. Dodatkowo, zwiększona ilość N-acetylo-asparagianinu może zasilać pulę asparagianinu, który w reakcji transaminacji tworzy szczawiooctan. Jednak obserwując brak zwiększenia ilości cytrynianu w CA2-4, DG po I/R wydaje się, że szczawiooctan powstały w reakcji z asparagianinem może raczej ulegać przemianie do jabłczanu niż do cytrynianu. Sugeruje się, że zwolnienie metabolizmu może być adaptacyjną odpowiedzią neuronów i/lub astrocytów na stres hipoksyjny (Hochachka i wsp. 1993), ischemiczny (Mršulja i wsp. 1988, Jørgensen i wsp. 1990) lub procesem zapobiegającym uszkodzeniu w warunkach hiperoksji (Richards i wsp. 2007). Ponadto, obniżony metabolizm, regulowany przez modyfikacje epigenetyczne, wydaje się być elementem tolerancji na niedokrwienie wywołanej prekondukcjonowaniem ischemicznym (Khoury i wsp. 2016).

Ilości bursztynianu, fumaranu i jabłczanu w mitochondriach regionu CA1 hipokampa w grupie I/R oraz I/R + β IIV5-3 są zbliżone do wartości kontrolnych (p. str. 77). Natomiast w mitochondriach obszaru CA2-4, DG na skutek I/R obserwowano wzrost ilości jabłczanu (w porównaniu do kontroli), który był skutecznie zahamowany poprzez zastosowanie inhibitora PKC β II. Podanie inhibitora β IIV5-3 wywołało w obszarze CA2-4, DG zmiany ilości metabolitów podobne do zmian obserwowanych w mitochondriach CA1 (I/R + β IIV5-3). Na tej podstawie można zasugerować, że zahamowanie poischemicznej translokacji PKC β II do mitochondriów regionu CA2-4, DG zapobiegło utrzymaniu potencjalnie neuroprotektynowego

hipometabolizmu⁴ w mitochondriach CA2-4, DG po godzinnej reperfuzji i skutkowało nabyciem wrażliwości tego regionu na uszkodzenie ischemiczno-reperfuzyjne.

Dotychczas uzyskane przeze mnie wyniki metabolomiczne nie wykluczają wpływu poischemicznych oddziaływań PKC β II na przeżycie komórek w regionie CA2-4, DG hipokampa, jednak opierając się wyłącznie na ich podstawie można jedynie spekulować czy w mitochondriach regionu

CA2-4, DG po I/R rzeczywiście dochodzi do neuroprotekcynowego zwolnienia metabolizmu energetycznego. Dalsze badania są wymagane do zweryfikowania i wyjaśnienia różnic w ilości metabolitów obserwowanych między mitochondriami z regionów CA1 i CA2-4, DG hipokampa.

Przeprowadzone przeze mnie badania nie tylko poszerzają dotychczasową wiedzę na temat roli kinaz białkowych C w procesach neuroprotekcji po epizodzie niedokrwinnym mózgu, ale również stanowią bazę do dalszych rozważań dotyczących tych zagadnień. Podczas realizacji projektu powstały liczne pytania, które pozostają otwarte, a poznanie odpowiedzi mogłoby przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmu endogennej protekcji uruchamianego w części CA2-4, DG hipokampa po I/R dzięki translokacji PKC β II do mitochondriów.

Należałoby zbadać mechanizm importu PKC β II do mitochondriów, ponieważ w świetle zaprezentowanych badań wydaje się być on pierwszym, niezbędnym etapem w procesie ochrony komórek nerwowych hipokampa po krótkotrwałej I/R. Poznanie tego zjawiska mogłoby umożliwić zaprojektowanie specyficznego aktywatora translokacji PKC β II, a następnie sprawdzenie skutków jego działania.

Innym aspektem wartym uwagi są oddziaływania PKC β II z białkami mitochondrialnymi. Nadal nie zostało poznane biologiczne znaczenie interakcji tej kinazy z wyżej opisanymi mitochondrialnymi białkami. Nie wiadomo czy i jaki wpływ może mieć PKC β II na funkcjonowanie tych białek w kontekście ochrony komórek nerwowych hipokampa po epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym. Dla niezbadanych jeszcze enzymów można zastosować testy aktywności analogiczne do tych użytych do badania aktywności dehydrogenazy pirogronianowej i syntazy ATP. Jednak należy wziąć pod uwagę, że PKC β II może wpływać nie tylko na aktywność enzymatyczną danego białka, ale również/lub na jego konformację, regulację funkcjonowania czy też lokalizację.

Ze względu na reakcję katalizowaną przez PKC słusznym podejściem wydaje się pomiar fosforylacji białek mitochondrialnych po I/R oraz po podaniu inhibitora PKC β II (β IIIV5-3). W

⁴ obserwowanego jako zwiększone ilości fumaranu i jablczanu w stosunku do ilości tych metabolitów w mitochondriach regionu CA1 hipokampa

tym projekcie podjęto próbę identyfikacji wszystkich ufosforylowanych białek (poznanie tzw. fosfoproteomu) w mitochondriach wyizolowanych z regionów CA1 i CA2-4, DG hipokampa po I/R za pomocą techniki spektrometrii mas dedykowanej do tego typu analiz (nie publikowano). Mimo licznych prób, z powodu trudności technicznych nie uzyskano jednoznacznych, satysfakcjonujących wyników. Dwie ścieżki badań wydają się możliwe do realizacji: (1) praca nad optymalizacją metody oznaczania ufosforylowanych białek w badanym materiale biologicznym z użyciem spektrometrii mas i późniejsze wykonanie oznaczeń dla prób kontrolnych, po I/R oraz po I/R i podaniu β IIV5-3 lub (2) przeprowadzenie *in vitro* reakcji fosforylacji z użyciem rekombinowanych białek (PKC β II i wybranego mitochondrialnego partnera), a następnie badanie poziomu fosforylacji produktu reakcji metodą western blot w warunkach opóźnienia migracji ufosforylowanych form białka (odczynnik Phostag).

W poniższej pracy dowiedziono, że poischemiczna obecność PKC β II w mitochondriach jest elementem neuroprotekcji. Jednak nie wiadomo, czy zjawisko to ma miejsce w neuronach, w astrocytach, czy może w obu rodzajach komórek. W przyszłości można byłoby rozważyć sprawdzenie tego w modelach ekscytotoksyczności lub OGD w osobnych hodowlach komórek *in vitro*. Używając takiego podejścia Sun i wsp. (2013) wykazali, że użycie specyficznego aktywatora translokacji PKC ϵ do mitochondriów powoduje przeniesienie tej kinazy do mitochondriów zarówno w neuronach jak i astrocytach, co działa ochronnie na oba rodzaje komórek w modelu OGD.

Przeprowadzone pilotażowe badania metabolomu mitochondrialnego w regionach hipokampa o różnej wrażliwości na niedokrwienie miały przede wszystkim posłużyć technicznej optymalizacji procesu ekstrakcji metabolitów i dostosowaniu warunków analizy instrumentalnej (czułość detekcji) ze względu na niewielkie (jak na standardy przyjęte w laboratorium CEMBIO) ilości materiału biologicznego. Dzięki zastosowanym modyfikacjom metod udało się uzyskać wyniki wstępne dla jednej (GC-MS) z trzech użytych przeze mnie platform rozdziału i detekcji⁵ prób. Dane otrzymane dzięki badaniom metabolomicznym prowadzonym na mitochondriach hipokampa stanowią wyzwanie w zakresie interpretacji. Często trudno jest precyzyjnie wyjaśnić obserwowane zmiany w ilości metabolitów: zdecydować jaki rodzaj komórek może być źródłem danej substancji, stwierdzić czy obserwowane zmiany w mitochondriach są korzystne lub szkodliwe dla komórki w danym momencie (tu: po 1 godzinie od niedokrwienia), czy dany metabolit należy do puli metabolizmu pozamitochondrialnego, czy wewnątrzmitochondrialnego. Mimo pewnych ograniczeń wynikających z zastosowania wybranych warunków doświadczenia

⁵ Podczas pobytu w laboratorium CEMBIO dodatkowo wykonano analizy metodami chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas oraz elektroforezy kapilarnej sprzężonej ze spektrometrią mas.

zdobyta wiedza może posłużyć do postawienia nowych hipotez i rozwoju kolejnych projektów badawczych. Jedną z możliwości weryfikacji otrzymanych wyników mogłoby być porównanie ich z wynikami wykonanych równolegle przeze mnie analiz w laboratorium CEMBio - chromatografii ciekłowej sprzężonej ze spektrometrią mas oraz elektroforezy kapilarnej sprzężonej ze spektrometrią mas, które są uzupełniające i częściowo komplementarne wobec GC-MS. Żeby zrozumieć lepiej biochemiczny dialog mitochondria-komórka w warunkach rozprzestrzeniania się sygnału ischemiczno-reperfuzyjnego można byłoby rozważyć przeprowadzenie równoległych badań metabolomów: mitochondrialnego i całej komórki, tak jak to proponuje Chen i wsp. (2016). Dodatkowo analizy te mogłyby być wykonane na „zredukowanym” (w porównaniu do obecnie przeze mnie stosowanego) modelu badawczym - OGD lub ekscytotoksyczności we współhodowlach neuronów i astrocytów hipokampa. Takie podejście umożliwiłoby przypisanie metabolitów wstępnie zidentyfikowanych jako zmieniające się w wyniku poischemicznej aktywności PKC β II w mitochondriach, do danego rodzaju komórek. Ponadto mogłoby ujawnić szczegóły metabolicznej współpracy między neuronami i astrocytami w warunkach modelu ischemii i reperfuzyj. W związku z tym, że morfologiczne skutki zahamowania translokacji PKC β II obserwowano w 7 dni po niedokrwieniu mózgu i zastosowaniu inhibitora, to można byłoby rozważyć oznaczenie metabolitów mitochondrialnych w różnych czasach po przywróceniu krążenia. Takie podejście stosowano dawniej, żeby móc zaobserwować dynamikę zmian pojedynczych metabolitów (Arai i wsp. 1986, Yasumoto i wsp. 1988), co uprawniało do rozważań na temat kolejności i/lub szybkości zmian metabolizmu w ischemii i reperfuzyj. Dalszy rozwój badań nad poznaniem neuroprotektynowego mechanizmu działania PKC β II w części hipokampa mało wrażliwej na krótkotrwałe niedokrwienie może ujawnić nowe czynniki molekularne, które w przyszłości mogą stać się celami interwencji farmakologicznej u pacjentów cierpiących z powodu niedokrwienia mózgu.

10. Podsumowanie i wnioski

1) Na podstawie wyników badań immunoreaktywności PKC β i jej dwóch izoform w frakcji mitochondrialnej regionów CA1 i CA2-4, DG hipokampa stwierdzono, że:

- w mitochondriach CA2-4, DG po I/R immunoreaktywność PKC β zwiększa się;
- PKC β II (a nie PKC β I) jest tą izoformą, której ilość zwiększa się w mitochondriach CA2-4, DG po I/R.

Poischemiczna obecność PKC β II w mitochondriach części hipokampa mało wrażliwego na ischemię CA2-4, DG sugeruje udział tej kinazy w rozprzestrzenianiu sygnału ischemiczno-reperfuzyjnego w tym obszarze mózgu.

2) Posługując się specyficznym inhibitorem translokacji PKC β II (β IIV5-3) wykazano, że:

- zwiększona, poischemiczna immunoreaktywność PKC β II w frakcji mitochondrialnej jest wynikiem przemieszczenia się tej kinazy z cytoplazmy do mitochondriów.
- PKC β II po upływie godziny od reperfuzji prawdopodobnie znajduje się w macierzy mitochondrialnej;
- PKC β II nie posiada klasycznej sekwencji kierującej do mitochondriów.

Powyższe dane sugerują, że translokacja PKC β II do mitochondriów, w regionie mało wrażliwym na ischemię - CA2-4, DG, po I/R jest pierwszym etapem jej działania, będącego odpowiedzią na sygnał ischemiczno-reperfuzyjny. Jednak poischemiczny mechanizm przemieszczania się PKC β II z cytoplazmy do mitochondriów pozostaje nieznany.

3) Stwierdzono, że zahamowanie translokacji/aktywności PKC β II:

- powoduje pogłębienie uszkodzenia wywołanego przez stres ekscytotoksyczny w modelu skrawków organotypowych hipokampa szczura;
- zwiększa liczbę martwych komórek w hipokampie myszokoczka poddanego I/R.

Otrzymane wyniki wskazują na udział PKC β II, obecnej w mitochondriach, w procesach prowadzących do przeżycia komórek po I/R w regionie hipokampa mało wrażliwym na niedokrwienie - CA2-4, DG.

4) Zidentyfikowano białka mitochondrialne, mogące oddziaływać z PKC β II po I/R. Są one zaangażowane w procesy istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki np. przemiany pirogronianu, łańcuch transportu elektronów czy metabolizm aminokwasów. Oznacza to, że PKC β II po translokacji z cytoplazmy do mitochondriów może oddziaływać z białkami mitochondrialnymi i zmieniać ich funkcjonowanie w taki sposób, że umożliwiają one przeżycie komórkom nerwowym po epizodzie niedokrwienno-reperfuzyjnym.

5) Dla dwóch białek zidentyfikowanych jako oddziałujące z PKC β II - dehydrogenazy pirogronianowej oraz mitochondrialnej syntazy ATP wykazano, że:

- ich aktywność i ilość w badanych warunkach (5 min. ischemia, 1 godz. reperfuzji), po wyizolowaniu z hipokampa nie zmieniają się w stosunku do kontroli;
- w badanych warunkach PKC β II nie wpływa na ilość i aktywność badanych enzymów;
- ilość i aktywność syntazy ATP różni się pomiędzy regionami hipokampa o różnej wrażliwości na niedokrwienie, co może tłumaczyć różną zdolność mitochondriów tych obszarów do syntezy ATP w warunkach stresu ischemiczno-reperfuzyjnego.

Wyniki pomiarów ilości i aktywności badanych enzymów, przeprowadzone na materiale wyizolowanym z hipokampa, w optymalnych warunkach działania enzymów sugerują, że PKC β II nie wpływa na ilość i aktywność dehydrogenazy pirogronianowej oraz syntazy ATP.

6) Analizy metabolomiczne dostarczyły nowych informacji:

- o różnicach w ilości metabolitów między mitochondriami regionów hipokampa o różnej wrażliwości na epizod ischemiczno-reperfuzyjny;
- dotyczących poischemicznych zmian metabolitów cyklu kwasu cytrynowego, które sugerują zwolnienie metabolizmu w regionie CA2-4, DG po godzinnej reperfuzji w porównaniu do CA1;
- sugerujących, że działanie inhibitora PKC β II (β IIV5-3) w mitochondriach każdego z badanych regionów hipokampa wywołuje podobną odpowiedź na poziomie metabolitów cyklu kwasu cytrynowego.

Weryfikacja obserwowanych różnic w metabolomach mitochondriów regionów CA1 i CA2-4, DG hipokampa może przyczynić się do lepszego zrozumienia zjawiska wybiórczej wrażliwości hipokampalnych komórek nerwowych oraz do poznania poischemicznego, mitochondrialnego mechanizmu działania PKC β II.

Ponadto:

Zastosowane modyfikacje sposobu ekstrakcji metabolitów oraz ich detekcji, dostosowane do niewielkiej ilości dostępnego materiału biologicznego, umożliwiły identyfikację szeregu związków niskocząsteczkowych w mitochondriach regionów CA1 i CA2-4, DG hipokampa. Powoduje to, że opracowane protokoły mogą być z powodzeniem użyte w przyszłości.

11. Bibliografia

- 1) Adams, H. P., Bendixen, B. H., Kappelle, L. J., Biller, J., Love, B. B., Gordon, D. L., Marsh, E. E., Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993, 24(1), s. 35-41.
- 2) Akers, R. F., Routtenberg, A., Calcium-promoted translocation of protein kinase C to synaptic membranes: relation to the phosphorylation of an endogenous substrate (protein F1) involved in synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience* 1987, 7(12), s. 3976-3983.
- 3) Almeida, A., Allen, K. L., Bates, T. E., Clark, J. B., Effect of reperfusion following cerebral ischaemia on the activity of the mitochondrial respiratory chain in the gerbil brain. *Journal of neurochemistry* 1995, 65(4), s. 1698-1703.
- 4) Amaral, D., Lavenex, P. *Hippocampal neuroanatomy*. W: The hippocampus book. Red. Anderson, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J. New York: Oxford University Press, 2007. s. 37.
- 5) Anastassiadis, T., Deacon, S. W., Devarajan, K., Ma, H., Peterson, J. R., Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nature biotechnology* 2011, 29(11), s. 1039-1045.
- 6) Anderson, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J. *The hippocampal formation*. W: The hippocampus book. Anderson, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J. New York: Oxford University Press, 2007. s. 3.
- 7) Antal, C.E., Newton, A.C., Spatiotemporal dynamics of phosphorylation in lipid second messenger signaling. *Molecular cellular proteomics : MCP* 2013; 12, s. 3498–3508.
- 8) Arai, H., Passonneau, J. V., Lust, W. D., Energy metabolism in delayed neuronal death of CA1 neurons of the hippocampus following transient ischemia in the gerbil. *Metabolic brain disease* 1986, 1(4), s. 263-278.
- 9) Araki, T., Kato, H., Inoue, T., Kogure, K., Regional impairment of protein synthesis following brief cerebral ischemia in the gerbil. *Acta neuropathologica* 1990, 79(5), s. 501-505.
- 10) Aronowski, J., Grotta, J.C., Strong, R., Waxham, M.N., Interplay between the gamma isoform of PKC and calcineurin in regulation of vulnerability to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000, 20, s. 343–349.
- 11) Arundine, M., Tymianski, M., Molecular mechanisms of glutamate dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci.* 2004, 61, s. 657– 668.
- 12) Asaoka, Y., Nakamura, S. I., Yoshida, K., Nishizuka, Y., Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends in biochemical sciences* 1992, 17(10), s. 414-417.
- 13) Baines, C. P., Song, C. X., Zheng, Y. T., Wang, G. W., Zhang, J., Wang, O. L., Guo, Y., Bolli, R., Cardwell, E.M., Ping, P., Protein kinase C ϵ interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circulation research* 2003, 92(8), s. 873-880.
- 14) Bakthavachalam, P., Shanmugam, P. S. T., Mitochondrial dysfunction–Silent killer in cerebral ischemia. *Journal of the neurological sciences* 2017, 375, s. 417-423.
- 15) Basu, A., Pal, D., Two faces of protein kinase C δ : the contrasting roles of PKC δ in cell survival and cell death. *The Scientific World Journal* 2010, 10, s. 2272-2284.

- 16) Bates, E., Bode, C., Costa, M., Gibson, C. M., Granger, C., Green, C., Grimes, K., Harrington, R., Huber, K., Kleiman, N., Mochly-Rosen, D., Roe, M., Sadowski, Z., Solomon, S., Widimsky, P., Intracoronary KAI-9803 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Circulation* 2008, 117(7), s. 886-896.
- 17) Begley, R., Liron, T., Baryza, J., Mochly-Rosen, D., Biodistribution of intracellularly acting peptides conjugated reversibly to Tat. *Biochemical and biophysical research communications* 2004, 318(4), s. 949-954.
- 18) Béjot, Y., Bailly, H., Durier, J., Giroud, M., Epidemiology of stroke in Europe and trends for the 21st century. *La Presse Médicale* 2016, 45(12), s. e391-e398.
- 19) Bender, D. A., Mayes, P. A. *Glikoliza i utlenianie pirogronianu*. W: Biochemia Harpera ilustrowana. Red. Murray, R. K., Granner, D.K., Rodwell, V. W. Warszawa: *Wydawnictwo Lekarskie PZWL*, 2008. s. 189
- 20) Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. *Fosforylacja oksydacyjna*. W: Biochemia. Warszawa: *PWN*, 2009. s. 502-540
- 21) Bhangoo, M. K., Tzankov, S., Fan, A. C., Dejgaard, K., Thomas, D. Y., Young, J. C., Multiple 40-kDa heat-shock protein chaperones function in Tom70-dependent mitochondrial import. *Molecular biology of the cell* 2007, 18(9), s. 3414-3428.
- 22) Blobel, G. C., Stribling, D. S., Fabbro, D., Stabel, S., Hannun, Y. A., Protein kinase C β II specifically binds to and is activated by F-actin. *Journal of Biological Chemistry* 1996, 271(26), s. 15823-15830.
- 23) Bodsch, W., Barbier, A., Oehmichen, M., Ophoff, B. G., Hossmann, K. A., Recovery of monkey brain after prolonged ischemia. II. Protein synthesis and morphological alterations. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1986, 6(1), s. 22-33.
- 24) Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Heusch, G., Schulz, R., Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic research in cardiology* 2010, 105(6), s. 771-785.
- 25) Bogaert, Y. E., Rosenthal, R. E., Fiskum, G., Postischemic inhibition of cerebral cortex pyruvate dehydrogenase. *Free Radical Biology and Medicine* 1994, 16(6), s. 811-820.
- 26) Borutaite, V., Toleikis, A., Brown, G. C., In the eye of the storm: mitochondrial damage during heart and brain ischaemia. *The FEBS journal* 2013, 280(20), s. 4999-5014.
- 27) Brekke, E. M., Morken, T. S., Widerøe, M., Håberg, A. K., Brubakk, A. M., Sonnewald, U., The pentose phosphate pathway and pyruvate carboxylation after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2014, 34(4), s. 724-734.
- 28) Bright, R., Mochly-Rosen, D., The role of protein kinase C in cerebral ischemic and reperfusion injury. *Stroke* 2005, 36(12), s. 2781-2790.
- 29) Bright, R., Raval, A.P., Dembner, J.M., Perez-Pinzon, M.A., Steinberg, G.K., Yenari, M.A., Mochly-Rosen, D., Protein kinase C delta mediates cerebral reperfusion injury in vivo. *J Neurosci.* 2004, 24, s. 6880-6888.
- 30) Broughton, B. R., Reutens, D. C., Sobey, C. G., Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 2009, 40(5), s. e331-e339.
- 31) Bu, X., Zhang, N., Yang, X., Liu, Y., Du, J., Liang, J., Xu, Q., Li, J., Proteomic analysis of cPKC β II-interacting proteins involved in HPC-induced neuroprotection against cerebral ischemia of mice. *Journal of neurochemistry* 2011, 117(2), s. 346-356.

- 32) Budas, G. R., Churchill, E. N., Disatnik, M. H., Sun, L., Mochly-Rosen, D., Mitochondrial import of PKC ϵ is mediated by HSP90: a role in cardioprotection from ischaemia and reperfusion injury. *Cardiovascular research* 2010, 88(1), s. 83-92.
- 33) Budas, G. R., Koyanagi, T., Churchill, E. N., Mochly-Rosen, D., Competitive inhibitors and allosteric activators of protein kinase C isoenzymes: a personal account and progress report on transferring academic discoveries to the clinic. *Biochemical Society Transactions* 2007, 35 (5) s. 1021-1026.
- 34) Busto, R., Globus, M. Y. T., Neary, J. T., Ginsberg, M. D., Regional alterations of protein kinase C activity following transient cerebral ischemia: effects of intraischemic brain temperature modulation. *Journal of neurochemistry* 1994, 63(3), s. 1095-1103.
- 35) Capuani, B., Pacifici, F., Pastore, D., Palmirotta, R., Donadel, G., Arriga, R., Bellia, A., Di Daniele, N., Rogliani, P., Abete, P., Sbraccia, P., Guadagni, F., Lauro, D., Della-Morte, D., The role of epsilon PKC in acute and chronic diseases: Possible pharmacological implications of its modulators. *Pharmacol Res.* 2016 Sep;111, s. 659-667
- 36) Cardell, M., Koide, T., Wieloch, T., Pyruvate dehydrogenase activity in the rat cerebral cortex following cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1989, 9(3), s. 350-357.
- 37) Chakravarthy, B.R., Wang, J., Tremblay, R., Atkinson, T.G., Wang, F., Li, H., Buchan, A.M., Durkin, J.P., Comparison of the changes in protein kinase C induced by glutamate in primary cortical neurons and by in vivo cerebral ischaemia. *Cell Signal.* 1998, 10, s. 291–295.
- 38) Chamorro, Á., Dirnagl, U., Urra, X., Planas, A. M., Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *The Lancet Neurology* 2016, 15(8), s. 869-881.
- 39) Chen, C. H., Budas, G. R., Churchill, E. N., Disatnik, M. H., Hurley, T. D., Mochly-Rosen, D., Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* 2008, 321(5895), s. 1493-1495.
- 40) Chen, W. W., Freinkman, E., Wang, T., Birsoy, K., Sabatini, D. M., Absolute quantification of matrix metabolites reveals the dynamics of mitochondrial metabolism. *Cell* 2016, 166(5), s. 1324-1337.
- 41) Chouchani, E. T., Pell, V. R., James, A. M., Work, L. M., Saeb-Parsy, K., Frezza, C., Krieg T., Murphy, M. P., A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury. *Cell metabolism* 2016, 23(2), s. 254-263.
- 42) Churchill, E. N., Mochly-Rosen, D., The roles of PKC δ and ϵ isoenzymes in the regulation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Biochemical Society Transactions* 2007, 35 (5), s. 1040-1042.
- 43) Churchill, E. N., Murriel, C. L., Chen, C. H., Mochly-Rosen, D., Szweda, L. I., Reperfusion-induced translocation of δ PKC to cardiac mitochondria prevents pyruvate dehydrogenase reactivation. *Circulation research* 2005, 97(1), s. 78-85.
- 44) Churchill, E. N., Qvit, N., Mochly-Rosen, D., Rationally designed peptide regulators of protein kinase C. *Trends in Endocrinology Metabolism* 2009, 20(1), s. 25-33.
- 45) Churchill, E. N., Szweda, L. I., Translocation of δ PKC to mitochondria during cardiac reperfusion enhances superoxide anion production and induces loss in mitochondrial function. *Archives of biochemistry and biophysics* 2005, 439(2), s. 194-199.

- 46) Crumrine, R. C., Dubyak, G., LaManna, J. C., Decreased protein kinase C activity during cerebral ischemia and after reperfusion in the adult rat. *Journal of neurochemistry* 1990, 55(6), s. 2001-2007.
- 47) Członkowska, A., Dlaczego nie ma skutecznego leczenia neuroprotekcijnego? *Polski Przegląd Neurologiczny* 2008, 4(A), s. 19-20.
- 48) Datta, A., Akatsu, H., Heese, K., Sze, S. K., Quantitative clinical proteomic study of autopsied human infarcted brain specimens to elucidate the deregulated pathways in ischemic stroke pathology. *Journal of proteomics* 2013, 91, s. 556-568.
- 49) Dave, K. R., Bhattacharya, S. K., Saul, I., DeFazio, R. A., Dezfulian, C., Lin, H. W., Raval, A.P., Perez-Pinzon, M. A., Activation of protein kinase C delta following cerebral ischemia leads to release of cytochrome C from the mitochondria via bad pathway. *PLoS one* 2011, 6(7), s. e22057.
- 50) Dave, K. R., DeFazio, R. A., Raval, A. P., Torraco, A., Saul, I., Barrientos, A., Perez-Pinzon, M. A. Ischemic preconditioning targets the respiration of synaptic mitochondria via protein kinase C ϵ . *Journal of Neuroscience* 2008, 28(16), s. 4172-4182.
- 51) Dave, K. R., Saul, I., Busto, R., Ginsberg, M. D., Sick, T. J., Pérez-Pinzón, M. A., Ischemic preconditioning preserves mitochondrial function after global cerebral ischemia in rat hippocampus. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism* 2001, 21(12), s.1401-1410.
- 52) DeBerardinis, R. J., Sayed, N., Ditsworth, D., Thompson, C. B., Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current opinion in genetics development* 2008, 18(1), 54-61.
- 53) Dekker, L. V., Parker, P. J., Protein kinase C-a question of specificity. *Trends in biochemical sciences*, 1994, 19(2), s. 73-77.
- 54) Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M. A., Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences* 1999, 22(9), s. 391-397.
- 55) Dirnagl, U., Meisel, A., Endogenous neuroprotection: mitochondria as gateways to cerebral preconditioning? *Neuropharmacology* 2008, 55(3), s. 334-344.
- 56) Dirnagl, U., Simon, R. P., Hallenbeck, J. M., Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends in neurosciences* 2003, 26(5), s. 248-254.
- 57) Domańska-Janik, K., Zalewska, T., Effect of brain ischemia on protein kinase C. *Journal of neurochemistry* 1992, 58(4), s. 1432-1439.
- 58) Durkin, J. P., Tremblay, R., Chakravarthy, B., Mealing, G., Morley, P., Small, D., Song, D., Evidence that the Early Loss of Membrane Protein Kinase C Is a Necessary Step in the Excitatory Amino Acid-Induced Death of Primary Cortical Neurons. *Journal of neurochemistry* 1997, 68(4), s. 1400-1412.
- 59) Durkin, J.P., Tremblay, R., Buchan, A., Blosser, J., Chakravarthy, B., Mealing, G., Morley, P., Song, D., An early loss in membrane protein kinase C activity precedes the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J Neurochem.* 1996, 66, s. 951-962.
- 60) Edmondson, R. D., Vondriska, T. M., Biederman, K. J., Zhang, J., Jones, R. C., Zheng, Y., Allen, D.L., Xiu, J.X., Cardwell, E.M., Pisano, M.R., Ping, P., Protein Kinase C ϵ Signaling Complexes Include Metabolism-and Transcription/Translation-related Proteins Complimentary Separation Techniques With LC/MS/MS. *Molecular Cellular Proteomics* 2002, 1(6), s. 421-433.
- 61) Eldadah, B. A., Faden, A. I., Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *Journal of neurotrauma* 2000, 17(10), s. 811-829.

- 62) Elias, J. E., Haas, W., Faherty, B. K., and Gygi, S. P., Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. *Nat. Methods* 2005, 2, s. 667–675
- 63) Felipo, V., Min, M. D., Grisolia, S., Inhibitors of protein kinase C prevent the toxicity of glutamate in primary neuronal cultures. *Brain research* 1993, 604(1-2), s. 192-196.
- 64) Fernández, E., Cuenca, N., García, M., De Juan, J., Two types of mitochondria are evidenced by protein kinase C immunoreactivity in the Müller cells of the carp retina. *Neuroscience letters* 1995, 183(3), s. 202-205.
- 65) Ferreira, J.C., Boer, B.N., Grinberg, M., Brum, P.C., Mochly-Rosen, D., Protein quality control disruption by PKCbetaII in heart failure; rescue by the selective PKCbetaII inhibitor, betaIIV5-3. *PLoS ONE* 2012, 7, e33175.
- 66) Ferreira, J.C., Brum, P.C., Mochly-Rosen, D., betaIIPKC and epsilonPKC isozymes as potential pharmacological targets in cardiac hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2011, 51, s. 479–484.
- 67) Ferreira, J.C., Koyanagi, T., Palaniyandi, S.S., Fajardo, G., Churchill, E.N., Budas, G., Disatnik, M.H., Bernstein, D., Brum, P.C., Mochly-Rosen, D., Pharmacological inhibition of betaIIPKC is cardioprotective in late-stage hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2011, 51, 980–987.
- 68) Fiskum, G., Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. *Journal of neurotrauma* 2000, 17(10), s. 843-855.
- 69) Folbergrova, J., Ljunggren, B., Norberg, K. and Siesjö, B.K., Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex. *Brain research*, 1974, 80(2), s.265-279.
- 70) Fujita, T., Asai, T., Andrassy, M., Stern, D. M., Pinsky, D. J., Zou, Y. S., Okada, M., Naka, Y., Schmidt, A.M., Yan, S.F., PKC β regulates ischemia/reperfusion injury in the lung. *The Journal of clinical investigation* 2004, 113(11), s. 1615-1623.
- 71) Fukasawa, Y., Tsuji, J., Fu, S. C., Tomii, K., Horton, P., Imai, K., MitoFates: improved prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites. *Molecular Cellular Proteomics* 2015, 14(4), s. 1113-1126.
- 72) Fukuchi, T., Katayama, Y., Kamiya, T., McKee, A., Kashiwagi, F., Terashi, A., The effect of duration of cerebral ischemia on brain pyruvate dehydrogenase activity, energy metabolites, and blood flow during reperfusion in gerbil brain. *Brain research* 1998, 792(1), s. 59-65.
- 73) Gagliardi, J.M., Batt, M., Khodja, R.H., Le bas, P., Mural thrombus of the aorta. *Ann Vasc Surg* 1988, 2, s. 201–204.
- 74) Gao, T., Newton, A. C., Invariant Leu preceding turn phosphorylation motif controls the interaction of protein kinase C with Hsp70. *Journal of Biological Chemistry* 2006, 281(43), s. 32461-32468.
- 75) Gao, T., Newton, A. C., The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(35), 31585-31592.
- 76) Garcia A, Barbas C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. *Methods Mol Biol.* 2011,708, s. 191-204.
- 77) Gould, C. M., Kannan, N., Taylor, S. S., Newton, A. C., The chaperones Hsp90 and Cdc37 mediate the maturation and stabilization of protein kinase C through a conserved PXXP motif in the C-terminal tail. *Journal of Biological Chemistry* 2009, 284(8), s. 4921-4935.

- 78) Grain, B. J., Westerkam, W. D., Harrison, A. H., Nadler, J. V., Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil: a silver impregnation study. *Neuroscience* 1988, 27(2), s. 387-402.
- 79) Granger D.N., Kvietys, P.R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015, 6, s. 524-551.
- 80) Green, A. R., Shuaib, A., Therapeutic strategies for the treatment of stroke. *Drug discovery today* 2006, 11(15-16), s. 681-693.
- 81) Guo, Y., Cheong, N., Zhang, Z., De Rose, R., Deng, Y., Farber, S. A., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S., Tim50, a component of the mitochondrial translocator, regulates mitochondrial integrity and cell death. *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279(23), s. 24813-24825.
- 82) Håberg, A., Qu, H., Haraldseth, O., Unsgård, G., Sonnewald, U., In vivo injection of [1-13C] glucose and [1, 2-13C] acetate combined with ex vivo 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy: a novel approach to the study of middle cerebral artery occlusion in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1998, 18(11), s. 1223-1232.
- 83) Håberg, A., Qu, H., Sonnewald, U., Glutamate and GABA metabolism in transient and permanent middle cerebral artery occlusion in rat: importance of astrocytes for neuronal survival. *Neurochemistry international* 2006, 48(6-7), s. 531-540.
- 84) Haines, B. A., Mehta, S. L., Pratt, S. M., Warden, C. H., Li, P. A., Deletion of mitochondrial uncoupling protein-2 increases ischemic brain damage after transient focal ischemia by altering gene expression patterns and enhancing inflammatory cytokines. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism* 2010, 30(11), s. 1825-1833.
- 85) Halestrap, A. P., Clarke, S. J., Khaliulin, I., The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 2007, 1767(8), s. 1007-1031.
- 86) Han, T., Zhan, W., Gan, M., Liu, F., Yu, B., Chin, Y. E., Wang, J. B., Phosphorylation of glutaminase by PKC ϵ is essential for its enzymatic activity and critically contributes to tumorigenesis. *Cell research* 2018, 28(6), s. 655-669.
- 87) Han, Z., Liu, X., Luo, Y., Ji, X., Therapeutic hypothermia for stroke: where to go?. *Experimental neurology* 2015, 272, s. 67-77.
- 88) Hankey, G. J., Jamrozik, K., Broadhurst, R. J., Forbes, S., Anderson, C. S., Long-term disability after first-ever stroke and related prognostic factors in the Perth Community Stroke Study, 1989–1990. *Stroke* 2002, 33(4), s. 1034-1040.
- 89) Hara, H., Onodera, H., Yoshidomi, M., Matsuda, Y., Kogure, K., Staurosporine, a novel protein kinase C inhibitor, prevents postischemic neuronal damage in the gerbil and rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990, 10, s. 646–653.
- 90) Harada, K., Maekawa, T., Shama, K. M. A., Yamashima, T., Yoshida, K. I., Translocation and Down-Regulation of Protein Kinase C- α -, β -, and γ Isoforms During Ischemia-Reperfusion in Rat Brain. *Journal of neurochemistry* 1999, 72(6), s. 2556-2564.
- 91) Harukuni, I., Bhardwaj, A., Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurologic clinics* 2006, 24(1), s. 1-21.
- 92) He, L., Lemasters, J. J., Dephosphorylation of the Rieske iron–sulfur protein after induction of the mitochondrial permeability transition. *Biochemical and biophysical research communications* 2005, 334(3), s. 829-837.

- 93) Heurteaux, C., Lauritzen, I., Widmann, C., Lazdunski, M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1995, 92(10), s. 4666-4670.
- 94) Hochachka, P. W., Clark, C. M., Brown, W. D., Stanley, C., Stone, C. K., Nickles, R. J., Zhu, G. G., Holden, J. E., The brain at high altitude: hypometabolism as a defense against chronic hypoxia?. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1994, 14(4), 671-679.
- 95) Horn, M., Schlote, W., Delayed neuronal death and delayed neuronal recovery in the human brain following global ischemia. *Acta neuropathologica* 1992, 85(1), s. 79-87.
- 96) Huang, K. P., The mechanism of protein kinase C activation. *Trends in neurosciences* 1989, 12(11), s. 425-432.
- 97) Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., Nishizuka, Y., Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *Journal of Biological Chemistry* 1977, 252(21), s. 7610-7616.
- 98) Insausti, R., Comparative anatomy of the entorhinal cortex and hippocampus in mammals. *Hippocampus* 1993, 3(S1), s. 19-26.
- 99) Ito, U., Spatz, M., Walker, J. T., Klatzo, I., Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Acta neuropathologica* 1975, 32(3), s. 209-223.
- 100) Jackson, C. W., Escobar, I., Xu, J., Perez-Pinzon, M. A., Effects of ischemic preconditioning on mitochondrial and metabolic neuroprotection: 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase and sirtuins. 2018, *Brain circulation*, 4(2), s. 54-61.
- 101) Jarmuszkiwicz, W., Woyda-Ploszczyca, A. Mitochondrialne białka rozprzegające: regulacja i rola fizjologiczna. *Postępy Biochemii* 2008, 54(2), s.179-187.
- 102) Jones, N. M., Bergeron, M. Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism* 2001, 21(9), s. 1105-1114.
- 103) Jönsson, A. C., Delavaran, H., Iwarsson, S., Ståhl, A., Norrving, B., Lindgren, A. Functional status and patient-reported outcome 10 years after stroke: the Lund Stroke Register. *Stroke* 2014, 45(6), s. 1784-1790
- 104) Jørgensen, M. B., Wright, D. C., Diemer, N. H., Postischemic glucose metabolism is modified in the hippocampal CA1 region depleted of excitatory input or pyramidal cells. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1990, 10(2), 243-251.
- 105) Jové, M., Portero-Otín, M., Naudí, A., Ferrer, I., Pamplona, R. Metabolomics of human brain aging and age-related neurodegenerative diseases. *Journal of Neuropathology Experimental Neurology* 2014, 73(7), s. 640-657.
- 106) Junker, H., Späte, K., Suofu, Y., Walther, R., Schwarz, G., Kammer, W., Nordheim, A., Walker, L.C., Runge, U., Kessler, C., Popa-Wagner, A., Proteomic identification of the involvement of the mitochondrial rieske protein in epilepsy. *Epilepsia* 2005, 46(3), s. 339-343.
- 107) Kaczmarek, L. K., Phorbol esters, protein phosphorylation and the regulation of neuronal ion channels. *Journal of experimental biology* 1986, 124(1), s. 375-392.
- 108) Kalogeris, T., Baines, C.P., Krenz, M., Korthuis, R.J., Cell biology of ischemia / reperfusion injury, *International Review of Cell and Molecular Biology* 2012. 298, s. 229–317.
- 109) Kalogeris, T., Bao, Y., Korthuis, R. J. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox biology* 2014, 2, s. 702-714.

- 110) Katayama, Y., Fukuchi, T., McKee, A., Terashi, A., Effect of nicardipine, a Ca²⁺ channel blocker, on pyruvate dehydrogenase activity and energy metabolites during cerebral ischemia and reperfusion in gerbil brain. *Brain research* 1998, 781(1-2), s. 212-217.
- 111) Katayama, Y., Muramatsu, H., Kamiya, T., McKee, A., Terashi, A., Ischemic tolerance phenomenon from an approach of energy metabolism and the mitochondrial enzyme activity of pyruvate dehydrogenase in gerbils. *Brain research* 1997, 746(1-2), s. 126-132.
- 112) Kharlamov AGA, Costa E, Hayes R, Armstrong D. Semisynthetic sphingolipids prevent protein kinase C translocation and neuronal damage in the perifocal area following a photochemically induced thrombotic brain cortical lesion. *J Neurosci.* 1993. 13, s. 2483–2494.
- 113) Khoury, N., Koronowski, K. B., and Perez-Pinzon, M. A., Long-term window of ischemic tolerance: An evolutionarily conserved form of metabolic plasticity regulated by epigenetic modifications?. *Journal of neurology and neuromedicine*, 2016, 1(2), 6.
- 114) Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S., Nishizuka, Y., Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. Subcellular distribution, purification, and properties. *Journal of Biological Chemistry* 1982, 257(22), s. 13341-13348.
- 115) Kim, S. H., Vlkolinsky, R., Cairns, N., Fountoulakis, M., Lubec, G., The reduction of NADH: Ubiquinone oxidoreductase 24-and 75-kDa subunits in brains of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Life sciences* 2001, 68(24), s. 2741-2750.
- 116) Kirino, T., Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain research* 1982, 239(1), s. 57-69.
- 117) Kirino, T., Tamura, A., Sano, K., Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta neuropathologica* 1984, 64(2), s. 139-147.
- 118) Kjonigsen, L.J., Leergaard, T.B., Witter, M.P., Bjaalie, J.G., Digital atlas of anatomical subdivisions and boundaries of the rat hippocampal region. *Frontiers in Neuroinformatics* 2011, 5, s. 1-7.
- 119) Kobayashi, A., Niewada, M., Czlonkowska, A., Ryglewicz, D., Trojanowski, T., Fiszer, U., Trombektomia w udarze niedokrwiennym mózgu—stanowisko Komitetu Nauk Neurologicznych Polskiej Akademii Nauk. *Nauka*, 2016 (3) s. 161-168.
- 120) Koponen, S., Kurkinen, K., Akerman, K.E., Mochly-Rosen, D., Chan, P.H., Koistinaho, J., Prevention of NMDA-induced death of cortical neurons by inhibition of protein kinase C zeta. *J Neurochem.* 2003, 86, s. 442– 450.
- 121) Koronowski, K. B., Khoury, N., Morris-Blanco, K. C., Stradecki-Cohan, H. M., Garrett, T. J., Perez-Pinzon, M. A., Metabolomics based identification of SIRT5 and protein kinase C epsilon regulated pathways in brain. *Frontiers in neuroscience* 2018, 12, 32.
- 122) Kostecky, B., Saurin, A.T., Purkiss, A., Parker, P.J., McDonald, N.Q., Recognition of an intra-chain tandem 14-3-3 binding site within PKCepsilon. *EMBO reports* 2009, 10, s. 983–989.
- 123) Kowalczyk, J. E., Beręsewicz, M., Gajkowska, B., Zablocka, B., Association of protein kinase C delta and phospholipid scramblase 3 in hippocampal mitochondria correlates with neuronal vulnerability to brain ischemia. *Neurochemistry international* 2009, 55(1-3), s. 157-163.
- 124) Kowalczyk, J. E., Kawalec, M., Beręsewicz, M., Dębski, J., Dadlez, M., Zablocka, B., Protein kinase C beta in postischemic brain mitochondria. *Mitochondrion* 2012, 12(1), s. 138-143.
- 125) Kowaltowski, A. J., Vercesi, A. E., Fiskum, G., Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. *Cell death and differentiation* 2000, 7(10), s. 903-910.

- 126) Kraft, A. S., Anderson, W. B., Cooper, H. L., Sando, J. J., Decrease in cytosolic calcium/phospholipid-dependent protein kinase activity following phorbol ester treatment of EL4 thymoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 1982, 257(22), s. 13193-13196.
- 127) Kubo, K., Ohno, S., Suzuki, K., Primary structures of human protein kinase C β I and β II differ only in their C-terminal sequences. *FEBS letters* 1987, 223(1), s. 138-142.
- 128) Kuligowski J, Sánchez-Illana Á, Sanjuán-Herráez D, Vento M, Quintás G. Intra-batch effect correction in liquid chromatography-mass spectrometry using quality control samples and support vector regression (QC-SVRC). *Analyst* 2015, 140(22), s. 7810-7817.
- 129) Kuo, J. F., Andersson, R. G., Wise, B. C., Mackerlova, L., Salomonsson, I., Brackett, N. L., Katoh, N., Shoji, M., Wrenn, R.W., Calcium-dependent protein kinase: widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin, and trifluoperazine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1980, 77(12), s. 7039-7043.
- 130) Kurkinen, K., Busto, R., Goldsteins, G., Koistinaho, J., and Pérez-Pinzón, M. A., Isoform-specific membrane translocation of protein kinase C after ischemic preconditioning. *Neurochemical research*, 2001, 26(10), s. 1139-1144.
- 131) Ladrech, S., Wang, J., Boukhaddaoui, H., Puel, J. L., Eybalin, M., Lenoir, M., Differential expression of PKC beta II in the rat organ of Corti. *European Journal of Neuroscience* 2007, 26(10), s. 2922-2930.
- 132) Lange-Asschenfeldt, C., Raval, A. P., Dave, K. R., Mochly-Rosen, D., Sick, T. J., Pérez-Pinzón, M. A., Epsilon protein kinase C mediated ischemic tolerance requires activation of the extracellular regulated kinase pathway in the organotypic hippocampal slice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2004, 24(6), 636-645.
- 133) Larriva-Sahd, J. A., Some predictions of Rafael Lorente de Nó 80 years later. *Frontiers in neuroanatomy* 2014, 8 (147).
- 134) Leker, R. R., Shohami, E., Cerebral ischemia and trauma—different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Research Reviews* 2002, 39(1), s. 55-73.
- 135) Leli, U., Cataldo, A., Shea, T. B., Nixon, R. A., Hauser, G., Distinct Mechanisms of Differentiation of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Protein Kinase C Activators and Inhibitors. *Journal of neurochemistry* 1992, 58(4), s. 1191-1198.
- 136) Liu, M., Tang, L., Liu, X., Fang, J., Zhan, H., Wu, H., Yang, H., An evidence-based review of related metabolites and metabolic network research on cerebral ischemia. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016, 9162074, s. 1-12.
- 137) Lo, E. H., A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nature medicine* 2008, 14(5), s. 497-500.
- 138) Lu, D., Sivaprasad, U., Huang, J., Shankar, E., Morrow, S., Basu, A. Protein kinase C- ϵ protects MCF-7 cells from TNF-mediated cell death by inhibiting Bax translocation. *Apoptosis* 2007, 12(10), s. 1893-1900.
- 139) Lundgren, J., Cardell, M., Wieloch, T., Siesjö, B. K., Preischemic hyperglycemia and postischemic alteration of rat brain pyruvate dehydrogenase activity. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism* 1990, 10(4), s. 536-541
- 140) Lust, W. D., Arai, H., Yasumoto, Y., Whittingham, T. S., Djuricic, B., Mrsulja, B. B., and Passonneau, J. V., *Ischemic encephalopathy*. W: Cerebral Energy Metabolism and Metabolic Encephalopathy. Red. McCandles, D.W., Boston, MA: Springer, 1985. s. 79-117

- 141) MacDonald JF, Kotecha SA, Lu WY, Jackson MF. Convergence of PKC-dependent kinase signal cascades on NMDA receptors. *Curr Drug Targets*. 2001, 2, s. 299–312.
- 142) Macleod MR, Petersson J, Norrving B, Hacke W, Dirnagl U, Wagner M, Schwab S; Hypothermia for Stroke: call to action 2010. European Hypothermia Stroke Research Workshop. *Int J Stroke*. 2010, 5(6), s. 489-492
- 143) Maiese K, Boniece IR, Skurat K, Wagner JA. Protein kinases modulate the sensitivity of hippocampal neurons to nitric oxide toxicity and anoxia. *J Neurosci Res*. 1993, 36, s. 77–87.
- 144) Majumder, P. K., Mishra, N. C., Sun, X., Bharti, A., Kharbanda, S., Saxena, S., Kufe, D., Targeting of protein kinase C delta to mitochondria in the oxidative stress response. *Cell growth and differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 2001, 12.9, s. 465-470.
- 145) Majumder, P. K., Pandey, P., Sun, X., Cheng, K., Datta, R., Saxena, S., ... Kufe, D. (2000). Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol-12-myristate-13-acetate-induced cytochrome C release and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275(29), s. 21793-21796.
- 146) Manev, H., Favaron, M., Guidotti, A., Costa, E. Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death." *Molecular pharmacology* 1989, 36(1), s. 106-112.
- 147) Márquez, J., Cardona, C., Campos-Sandoval, J. A., Peñalver, A., Tosina, M., Matés, J. M., Martín-Rufián, M., Mammalian glutaminase isozymes in brain. *Metabolic brain disease* 2013, 28(2), s. 133-137.
- 148) Martín-Sierra, C., Requena, T., Frejo, L., Price, S. D., Gallego-Martinez, A., Batuecas-Caletrio, A., Santos-Pérez, S., Soto-Varela, A., Lysakowski, A., Lopez-Escamez, J. A., A novel missense variant in PRKCB segregates low-frequency hearing loss in an autosomal dominant family with Meniere's disease. *Human molecular genetics* 2016, 25(16), s. 3407-3415.
- 149) Matsumoto, S., Shamloo, M., Matsumoto, E., Isshiki, A., Wieloch, T., Protein kinase C- γ and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II- α are persistently translocated to cell membranes of the rat brain during and after middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2004, 24(1), s. 54-61.
- 150) Mattiasson, G., Shamloo, M., Gido, G., Mathi, K., Tomasevic, G., Yi, S., Warden, C.H., Castilho, R.F., Melcher, T., Gonzalez-Zulueta, M., Nikolich, K., Wieloch, T. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nature medicine* 2003, 9(8), s. 1062-1068.
- 151) McBride, H. M., Neuspiel, M., Wasiak, S., Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology* 2006, 16(14), s. R551-R560.
- 152) McDonnell, M. E., Bian, H., Wrobel, J., Smith, G. R., Liang, S., Ma, H., Reitz, A. B., Anilino-monoindolylmaleimides as potent and selective JAK3 inhibitors. *Bioorganic medicinal chemistry letters* 2014, 24(4), s. 1116-1121.
- 153) McKenna, M. C., Diemel, G. A., Sonnewald, U., Waagepetersen, H. S., Schousboe, A. *Energy metabolism of the brain*. W: Basic Neurochemistry (Eighth Edition). Red. Brady, S. T., Siegel, G. J., Albers, R. W., Price, D. L. Waltham, MA, Oxford: Elsevier Inc. 2012. s. 200-231.
- 154) McKenna, M. C., Waagepetersen, H. S., Schousboe, A., Sonnewald, U. Neuronal and astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer of reducing equivalents: current evidence and pharmacological tools. *Biochemical pharmacology* 2006, 71(4), s. 399-407.
- 155) Michaelis, E. K., Selective neuronal vulnerability in the hippocampus: relationship to neurological diseases and mechanisms for differential sensitivity of neurons to stress. W: The

- Clinical Neurobiology of the Hippocampus: An integrative view . Red. Bartsch T. Oxford: Oxford University Press. 2012. s. 54-76.
- 156) Michejda J., Import bialek do mitochondriow, *Kosmos* 1997, 1 (234), s. 71-80
- 157) Mochly-Rosen, D., Das, K., Grimes, K. V., Protein kinase C, an elusive therapeutic target?. *Nature reviews Drug discovery* 2012, 11(12), s. 937-957.
- 158) Mochly-Rosen, D., Khaner, H., Lopez, J., Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991, 88(9), s. 3997-4000.
- 159) Moskowitz, M. A., Lo, E. H., Iadecola, C., The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 2010, 67(2), s. 181-198.
- 160) Mršulja, B. B., Ueki, Y., and Lust, W. D., Delayed hypometabolism induced by bilateral ischemia in the gerbil: regional metabolic thresholds. *Metabolic brain disease*, 1988, 3(4), 279-285.
- 161) Muir, K. W., Teal, P. A., Why have neuroprotectants failed?. *Journal of neurology* 2005, 252(9), s. 1011-1020.
- 162) Murriel, C. L., Mochly-Rosen, D., Opposing roles of δ and ϵ PKC in cardiac ischemia and reperfusion: targeting the apoptotic machinery. *Archives of biochemistry and biophysics* 2003, 420(2), s. 246-254.
- 163) Nakajima, T., Iwabuchi, S., Miyazaki, H., Okuma, Y., Inanami, O., Kuwabara, M., Nomura, Y., Kawahara, K., Relationship between the activation of cyclic AMP responsive element binding protein and ischemic tolerance in the penumbra region of rat cerebral cortex. *Neuroscience letters* 2002, 331(1), s. 13-16.
- 164) Nelson, D. L., Cox, M. M., *The citric acid Cycle*. W: Lehninger principles of biochemistry (5th ed.). New York ; New Delhi: W.H. Freeman, 2008. s. 615-620
- 165) Neupert, W., Herrmann, J. M., Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 2007, 76, s. 723-749.
- 166) Newcomb, R., Pierce, A. R., Kano, T., Meng, W., Bosque-Hamilton, P., Taylor, L., Curthoys, N., Lo, E. H., Characterization of mitochondrial glutaminase and amino acids at prolonged times after experimental focal cerebral ischemia. *Brain research* 1998, 813(1), s. 103-111.
- 167) Newton, A. C., Protein kinase C: perfectly balanced. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 2018, 53(2), s. 208-230.
- 168) Newton, A. C., Protein kinase C: structure, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry* 1995, 270(48), s. 28495-28498.
- 169) Nguyen, T. T., Oghi, M., Yu, Q., Fishman, J. B., Thomas, W., Harvey, B. J., Fulton, D., Johnson, J. A., Modulation of the Protein Kinase C δ Interaction with the “d” Subunit of F1F0-ATP Synthase in Neonatal Cardiac Myocytes Development Of Cell-Permeable, Mitochondrially Targeted Inhibitor And Facilitator Peptides. *Journal of Biological Chemistry* 2010, 285(29), s. 22164-22173.
- 170) Nguyen, T., Oghi, M., Johnson, J. A., Delta Protein Kinase C Interacts with the d Subunit of the F1F0 ATPase in Neonatal Cardiac Myocytes Exposed to Hypoxia or Phorbol Ester Implications For F1FO ATPase Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 2008, 283(44), s. 29831-29840.
- 171) Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *The FASEB Journal*, 9(7), s. 484-496.

- 172) Nishizuka, Y., Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C., *Science* 1992, 258(5082), s. 607-614.
- 173) Nishizuka, Y., Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 1986, 233(4761), s. 305-312.
- 174) Niu, C., Li, J., Cui, X., Han, S., Zu, P., Li, H., Xu, Q., Changes in cPKC isoform-specific membrane translocation and protein expression in the brain of hypoxic preconditioned mice. *Neuroscience letters* 2005, 384(1-2), s.1-6.
- 175) Norberg, K., Siejö, B. K., Cerebral metabolism in hypoxic hypoxia. II. Citric acid cycle intermediates and associated amino acids. *Brain Research*, 1975, 86, no. 1, s. 45-54.
- 176) Nowak, G., Bakajsova, D., Protein kinase C- α activation promotes recovery of mitochondrial function and cell survival following oxidant injury in renal cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2012, 303(4), s. F515-F526.
- 177) Nowak, G., Bakajsova, D., Protein kinase C- α interaction with F0F1-ATPase promotes F0F1-ATPase activity and reduces energy deficits in injured renal cells. *Journal of Biological Chemistry* 2015, 290(11), s. 7054-7066.
- 178) Ogbi, M., Johnson, J. A., Protein kinase C ϵ interacts with cytochrome c oxidase subunit IV and enhances cytochrome c oxidase activity in neonatal cardiac myocyte preconditioning. *Biochemical Journal* 2006, 393(1), s. 191-199.
- 179) Ordy JM, Wengenack TM, Bialobok P, Coleman PD, Rodier P, Baggs RB, Dunlap WP, Kates B. Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP-positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. *Exp Neurol.* 1993,119, s. 128–139.
- 180) Orr, J. W., Keranen, L. M., Newton, A. C. Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *Journal of Biological Chemistry* 1992, 267(22), s. 15263-15266.
- 181) Palaniyandi, S. S., Sun, L., Ferreira, J. C. B., Mochly-Rosen, D., Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target?. *Cardiovascular research* 2009, 82(2), s. 229-239.
- 182) Parton, R. G., Simons, K., The multiple faces of caveolae. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007, 8(3), s. 185-194.
- 183) Patel, M. S., Korotchkina, L. G., Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Soc Trans.* 2006, 34(Pt 2), s. 217-222.
- 184) Patel, M. S., The relative significance of CO₂-fixing enzymes in the metabolism of rat brain. *Journal of neurochemistry* 1974, 22(5), s. 717-724.
- 185) Pera, J. *Neuroprotekcja w udarze*. W: *Udar mózgu*. Red. Szczudlik, A., Członkowska, A., Kwieciński, H., Slowik, A. Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2007. s. 242-257.
- 186) Perez-Pinzon, M. A., Dave, K. R., Raval, A. P., Role of reactive oxygen species and protein kinase C in ischemic tolerance in the brain. *Antioxidants redox signaling* 2005, 7(9-10), s. 1150-1157.
- 187) Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli Q WA, Plum F. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* 1987, 37, s.1281–1286.
- 188) Petito, C. K., Pulsinelli, W. A., Delayed neuronal recovery and neuronal death in rat hippocampus following severe cerebral ischemia: possible relationship to abnormalities in neuronal processes. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1984, 4(2), s. 194-205.

- 189) Petrozzi, L., Ricci, G., Giglioli, N. J., Siciliano, G., Mancuso, M., Mitochondria and neurodegeneration. *Bioscience reports* 2007, 27(1-3), s. 87-104.
- 190) Pirttilä, T. R., Kauppinen, R. A., Recovery of intracellular pH in cortical brain slices following anoxia studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy: role of lactate removal, extracellular sodium and sodium/hydrogen exchange. *Neuroscience* 1992, 47(1), s. 155-164.
- 191) Pulsinelli, W. A., Brierley, J. B., Plum, F., Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Annals of neurology* 1982, 11(5), s. 491-498.
- 192) Qi, X., Mochly-Rosen, D., The PKC δ -Abl complex communicates ER stress to the mitochondria—an essential step in subsequent apoptosis. *J Cell Sci* 2008, 121(6), s. 804-813.
- 193) Qvit, N., Disatnik, M. H., Sho, E., Mochly-Rosen, D., Selective phosphorylation inhibitor of delta protein kinase C—pyruvate dehydrogenase kinase protein—protein interactions: application for myocardial injury in vivo. *Journal of the American Chemical Society* 2016, 138(24), s. 7626-7635.
- 194) Rajah, M. N., Kromas, M., Han, J. E., Pruessner, J. C., Group differences in anterior hippocampal volume and in the retrieval of spatial and temporal context memory in healthy young versus older adults. *Neuropsychologia* 2010, 48(14), s. 4020-4030.
- 195) Ramos-Cabrer, P., Campos, F., Sobrino, T., Castillo, J., Targeting the ischemic penumbra. *Stroke* 2011, 42(1 suppl 1), s. S7-S11.
- 196) Raval, A. P., Dave, K. R., DeFazio, R. A., Perez-Pinzon, M. A., ϵ PKC phosphorylates the mitochondrial K⁺ ATP channel during induction of ischemic preconditioning in the rat hippocampus. *Brain research* 2007, 1184, s. 345-353.
- 197) Raval, A.P., Dave, K.R., Mochly-Rosen, D., Sick, T.J., Perez-Pinzon, M.A., Epsilon PKC is required for the induction of tolerance by ischemic and NMDA-mediated preconditioning in the organotypic hippocampal slice. *J Neurosci.* 2003; 23, s. 384–391.
- 198) Rehncrona, S., Rosén, I., Siesjö, B. K., Excessive cellular acidosis: an important mechanism of neuronal damage in the brain?. *Acta Physiologica Scandinavica* 1980, 110(4), s. 435-437.
- 199) Richards, E. M., Fiskum, G., Rosenthal, R. E., Hopkins, I., and McKenna, M. C., Hyperoxic reperfusion after global ischemia decreases hippocampal energy metabolism. *Stroke*, 2007, 38(5), 1578-1584.
- 200) Rytter, A., Cronberg, T., Asztély, F., Nemali, S., Wieloch, T., Mouse hippocampal organotypic tissue cultures exposed to in vitro "ischemia" show selective and delayed CA1 damage that is aggravated by glucose. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003, 23(1), s. 23-33.
- 201) Sacco, R. L., Kasner, S. E., Broderick, J. P., Caplan, L. R., Culebras, A., Elkind, M. S., George, M.G., Hamdan, A.D., Higashida, R.T., Hoh, B.L., Janis, L.S., Kase, C.S., Kleindorfer, D.O., Lee, J.M., Moseley, M.E., Peterson, E.D., Turan, T.N., Valderrama, A.L., Vinters, H.V., American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Epidemiology and Prevention; Council on Peripheral Vascular Disease; Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism., An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2013, 44(7), s. 2064-2089

- 202) Sakai, N., Sasaki, K., Ikegaki, N., Shirai, Y., Ono, Y., Saito, N., Direct visualization of the translocation of the γ -subspecies of protein kinase C in living cells using fusion proteins with green fluorescent protein. *The Journal of cell biology* 1997, 139(6), s. 1465-1476.
- 203) Sanganalmath, S. K., Gopal, P., Parker, J. R., Downs, R. K., Parker, J. C., Dawn, B., Global cerebral ischemia due to circulatory arrest: insights into cellular pathophysiology and diagnostic modalities. *Molecular and cellular biochemistry* 2017, 426(1-2), s. 111-127.
- 204) Savitz, S. I., Baron, J. C., Yenari, M. A., Sanossian, N., Fisher, M., Reconsidering Neuroprotection in the Reperfusion Era. *Stroke* 2017, 48(12), s. 3413-3419.
- 205) Sawicki, W. H., Malejczyk, J. H. *Układ nerwowy*. W: Histologia. Warszawa: Wydawnictwo lekarskie PZWL, 2012. s. 388-389.
- 206) Schaller, B., Graf, R., Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2004, 24(4), s. 351-371.
- 207) Schechtman, D., Mochly-Rosen, D., Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene* 2001, 20, s. 6339-6347.
- 208) Schmidt-Kastner, R., Freund, T. F., Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 1991, 40(3), s. 599-636.
- 209) Selvatici R, Marino S, Piubello C, Rodi D, Beani L, Gandini E, Siniscalchi A. Protein kinase C activity, translocation, and selective isoform subcellular redistribution in the rat cerebral cortex after in vitro ischemia. *J Neurosci Res*. 2003, 71, s. 64 -71.
- 210) Shank, R. P., Bennett, G. S., Freytag, S. O., Campbell, G. L., Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain research* 1985, 329(1-2), s. 364-367.
- 211) Sidoryk, M., Glutamine transport in the central nervous system. *Postępy biochemii* 2004, 50(4), s. 363
- 212) Sieber, F. E., Traystman, R. J., Martin, L. J., Delayed neuronal death after global incomplete ischemia in dogs is accompanied by changes in phospholipase C protein expression. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1997, 17(5), s. 527-533.
- 213) Siesjö, B. K., Ekholm, A., Katsura, K., Theander, S., Acid-base changes during complete brain ischemia. *Stroke* 1990, 21(11 Suppl), III, s.194-199
- 214) Siesjö, B. K., Elmer, E., Janelidze, S., Keep, M., Kristian, T., Ouyang, Y. B., Uchino, H. *Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure*. W: Current Progress in the Understanding of Secondary Brain Damage from Trauma and Ischemia. Red. Baethmann, A., Plesnila, N., Ringel, F., Eriskat, J. Vienna: Springer, 1999. s. 7-13
- 215) Sims, N. R., Muyderman, H., Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2010, 1802(1), s. 80-91.
- 216) Sivaprasad, U., Shankar, E., Basu, A., Downregulation of Bid is associated with PKC ϵ -mediated TRAIL resistance. *Cell death and differentiation* 2007, 14(4), s. 851-860.
- 217) Słowik, A. *Leczenie przyczynowe udaru niedokrwiennego mózgu*. W: Udary mózgu – rosnący problem w starzejącym się społeczeństwie. Raport Instytutu Ochrony Zdrowia. Red. Raciborski, F., Gujski, M., Warszawa: Instytut Ochrony Zdrowia, 2016. s. 74-78
- 218) Stahelin, R. V., Ready, set, go! How protein kinase c manages dynamic signaling. *Chemistry biology* 2014, 21(4), s. 433-434.
- 219) Stebbins, E. G., Mochly-Rosen, D., Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of β II protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276(32), s. 29644-29650.

- 220) Stoppini, L., P-A. Buchs, and Dominique Muller. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of neuroscience methods* 1991, 37(2), s. 173-182.
- 221) Strosznajder, J. *Czynniki biochemiczne inicjujące niedokrwienie*. W: Mózg a niedokrwienie. Red. Strosznajder, B., Czernicki, Z. Kraków: Wydawnictwo Platan, 2005. s. 164-191.
- 222) Strumilo, S., Short-term regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Acta Biochim. Pol* 2005, 52(4), s. 759-764.
- 223) Sugawara, K., Fujikawa, M., Yoshida, M., Screening of protein kinase inhibitors and knockdown experiments identified four kinases that affect mitochondrial ATP synthesis activity. *FEBS letters* 2013, 587(23), s. 3843-3847.
- 224) Sugawara, T., Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Kawase, M., Chan, P.H., Mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci.* 1999, 19, s. RC39.
- 225) Sun, X., Budas, G. R., Xu, L., Barreto, G. E., Mochly-Rosen, D., Giffard, R. G., Selective activation of protein kinase C ϵ in mitochondria is neuroprotective in vitro and reduces focal ischemic brain injury in mice. *Journal of neuroscience research* 2013, 91(6), s. 799-807.
- 226) Suzuki, R., Yamaguchi, T., Li, C. L., Klatzo, I., The effects of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils: II. Changes of spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA1 sector of hippocampus. *Acta neuropathologica* 1983, 60(3-4), s. 217-222.
- 227) Szermer, P., Szczudlik, A. *Udar – zasady postępowania*. W: Udar mózgu. Red. Szczudlik, A., Członkowska, A., Kwieciński, H., Slowik, A. Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2007. s. 234-241.
- 228) Tahir, R. A., Pabaney, A. H., Therapeutic hypothermia and ischemic stroke: A literature review. *Surgical Neurology International* 2016, 7 (Suppl 14), s. S381–S386.
- 229) Takeda, Y., Pérez-Pinzón, M. A., Ginsberg, M. D., Sick, T. J. Mitochondria consume energy and compromise cellular membrane potential by reversing ATP synthetase activity during focal ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2004, 24(9), s. 986-992.
- 230) Tanaka, M., Sagawa, S., Hoshi, J. I., Shimoma, F., Matsuda, I., Sakoda, K., Sasase, T., Shindo, M., Inaba, T., Synthesis of anilino-monoindolylmaleimides as potent and selective PKC β inhibitors. *Bioorganic medicinal chemistry letters* 2004, 14(20), s. 5171-5174.
- 231) Thilmann, R., Xie, Y., Kleihues, P., Kiessling, M., Persistent inhibition of protein synthesis precedes delayed neuronal death in postischemic gerbil hippocampus. *Acta neuropathologica* 1986, 71(1-2), s. 88-93.
- 232) Thompson, J. W., Narayanan, S. V., Koronowski, K. B., Morris-Blanco, K., Dave, K. R., Perez-Pinzon, M. A., Signaling pathways leading to ischemic mitochondrial neuroprotection. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 2015, 47(1-2), s. 101-110.
- 233) Tymianski, M., Combining Neuroprotection With Endovascular Treatment of Acute Stroke: Is There Hope?. *Stroke* 2017, 48(6), s. 1700-1705.
- 234) Uchino, H., Chijiwa, M., Ogihara, Y., Elmer, E., *Molecular Mechanisms of Brain Ischemia and Its protection*. W: Neuroanesthesia and Cerebrospinal Protection. Red. Uchino, H., Ushijima, K., Ikeda, Y. Tokio:Springer, 2015. s. 39-52.
- 235) Ueda, M., Muramatsu, H., Kamiya, T., Muramatsu, A., Mori, T., Terashi, A., Katayama, Y., Pyruvate dehydrogenase activity and energy metabolite levels following bilateral common carotid artery occlusion in rat brain. *Life sciences* 2000, 67(7), s. 821-826.

- 236) Vijayvergiya, C., Beal, M. F., Buck, J., Manfredi, G., Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Journal of Neuroscience* 2005, 25(10), s. 2463-2470.
- 237) Wang, G., Chen, Z., Zhang, F., Jing, H., Xu, W., Ning, S., Li Z., Liu K., Yao J., Tian, X., Blockade of PKC β protects against remote organ injury induced by intestinal ischemia and reperfusion via a p66shc-mediated mitochondrial apoptotic pathway. *Apoptosis* 2014, 19(9), s. 1342-1353.
- 238) Wang, J., Bright, R., Mochly-Rosen, D., Giffard, R. G., Cell-specific role for ϵ - and β I-protein kinase C isozymes in protecting cortical neurons and astrocytes from ischemia-like injury. *Neuropharmacology* 2004, 47(1), s. 136-145.
- 239) Wang, X., Zaidi, A., Pal, R., Garrett, A. S., Bracer, R., Chen, X. W., Michaelis, M.L., Michaelis, E. K., Genomic and biochemical approaches in the discovery of mechanisms for selective neuronal vulnerability to oxidative stress. *BMC neuroscience* 2009, 10(1), s. 12.
- 240) Wang, Y., Biswas, G., Prabu, S. K., Avadhani, N. G., Modulation of mitochondrial metabolic function by phorbol 12-myristate 13-acetate through increased mitochondrial translocation of protein kinase C α in C2C12 myocytes. *Biochemical pharmacology* 2006, 72(7), s. 881-892.
- 241) White, B. C., Grossman, L. I., O'neil, B. J., DeGracia, D. J., Neumar, R. W., Rafols, J. A., Krause, G. S., Global brain ischemia and reperfusion. *Annals of emergency medicine* 1996, 27(5), s. 588-594.
- 242) Wolf, M., LeVine, H., May, W. S., Cuatrecasas, P., Sahyoun, N., A model for intracellular translocation of protein kinase C involving synergism between Ca²⁺ and phorbol esters. *Nature* 1985, 317(6037), s. 546-549.
- 243) Wu, D. Y., Zheng, J. Q., McDonald, M. A., Chang, B., Twiss, J. L., PKC isozymes in the enhanced regrowth of retinal neurites after optic nerve injury. *Investigative ophthalmology visual science* 2003, 44(6), s. 2783-2790.
- 244) Xu, G., Perez-Pinzon, M. A., Sick, T. J., Mitochondrial complex I inhibition produces selective damage to hippocampal subfield CA1 in organotypic slice cultures. *Neurotoxicity research* 2003, 5(7), s. 529-537.
- 245) Yamamoto, K., Morimoto, K., Yanagihara, T., Cerebral ischemia in the gerbil: transmission electron microscopic and immunoelectron microscopic investigation. *Brain research* 1986, 384(1), s. 1-10.
- 246) Yang, L., Kasumov, T., Yu, L., Jobbins, K. A., David, F., Previs, S. F., Kelleher, J. K., Brunengraber, H., Metabolomic assays of the concentration and mass isotopomer distribution of gluconeogenic and citric acid cycle intermediates. *Metabolomics*, 2006, 2(2), s. 85-94.
- 247) Yang, X., Zhang, X., Li, Y., Han, S., Howells, D. W., Li, S., Li, J., Conventional protein kinase C β -mediated phosphorylation inhibits collapsin response-mediated protein 2 proteolysis and alleviates ischemic injury in cultured cortical neurons and ischemic stroke-induced mice. *Journal of neurochemistry* 2016, 137(3), s. 446-459.
- 248) Yang, Y., Shi, Y. Z., Zhang, N., Wang, S., Ungvari, G. S., Ng, C. H., Wang, Y.L., Zhao, X.Q., Wang, Y.J., Wang, C.X., Xiang, Y. T., The disability rate of 5-year post-stroke and its correlation factors: a national survey in China. *PLoS one* 2016, 11(11), s. e0165341.
- 249) Yasumoto, Y., Passonneau, J. V., Feussner, G., Lust, W. D., Metabolic alterations in fiber layers of the CA 1 region of the gerbil hippocampus following short-term ischemia: High-energy

- phosphates, glucose-related metabolites, and amino acids. *Metabolic brain disease* 1988, 3(2), s. 133-149.
- 250) Young, J. C., Hoogenraad, N. J., Hartl, F. U., Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 2003, 112(1), s. 41-50.
- 251) Zablocka, B., Gajkowska, B., Czechmańska, T., Domańska-Janik, K., Isoforms of protein kinase C in postsynaptic densities after cerebral ischemia. *Brain research* 2001, 889(1), s. 105-111.
- 252) Zaidan, E., Sims, N. R., Selective reductions in the activity of the pyruvate dehydrogenase complex in mitochondria isolated from brain subregions following forebrain ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1993, 13(1), s. 98-104.
- 253) Zemke, D., Smith, J. L., Reeves, M. J., Majid, A., Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. *Neurotoxicology* 2004, 25(6), s. 895-904.
- 254) Zhao, L. R., Willing, A., Enhancing endogenous capacity to repair a stroke-damaged brain: an evolving field for stroke research. *Progress in neurobiology* 2018, 163-164, s. 5-26.
- 255) Zheng, H., Liu, J., Liu, C., Lu, F., Zhao, Y., Jin, Z., Ren, H., Leng, X., Jia, J., Hu, G., Dong, S., Zhong, X., Li, H., Yang, B., Xu, C., Zhang, W., Calcium-sensing receptor activating phosphorylation of PKC δ translocation on mitochondria to induce cardiomyocyte apoptosis during ischemia/reperfusion. *Molecular and cellular biochemistry* 2011, 358(1-2), s. 335-343.
- 256) Zola-Morgan, S., Squire, L. R., Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. *Behavioral neuroscience* 1986, 100(2), s. 155-160.

11.1 E-źródła

- 1) Baza danych UniProt [online], the European Bioinformatics Institute, the Swiss Institute of Bioinformatics and the Protein Information Resource, 2018 [dostęp 05.02.2018]. Dostępny w Internecie: <https://www.uniprot.org>
- 2) MitoFates [online], Fukasawa, Y., Junko Tsuji, J., Fu, S-H., Tomii, K., Horton, P., Imai, K. 2015 [dostęp 10.01.2017]. Dostępny w Internecie: <http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi>
- 3) The top 10 causes of death [online], World Health Association, 2017 [dostęp 30.04.2018]. Dostępny w Internecie: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>

11.2 Spis rycin

Ryc. 1 Postępujące w czasie powiększanie się obszaru martwiczego spowodowanego ogniskowym niedokrwieniem mózgu.....	17
Ryc. 2 Podział hipokampa na regiony i jego warstwowa budowa.....	20
Ryc. 3 Porównanie hipokampów wyizolowanych od zwierząt kontrolnych i poddanych 7-dniowej reperfuzji po 5-min ischemii.	21
Ryc. 4 Przemieszczanie się PKC do różnych przedziałów komórki jest przyczyną odmiennych reakcji.....	27
Ryc. 5 Porównanie sekwencji aminokwasowej PKC β I i PKC β II.	29
Ryc. 6 Działanie i skład aminokwasowy peptydowego inhibitora PKC β II.	35

Ryc. 7 Przebieg doświadczenia w modelu uszkodzenia ekscytotoksycznego organotypowych skrawków hipokampa	42
Ryc. 8 Parametry metody rozdziału mitochondrialnych metabolitów za pomocą GC-MS.	49
Ryc. 9 Wzrost immunoreaktywności PKC β obserwowany jest w mitochondriach w części CA2-4, DG hipokampa zwierząt poddanych 5-minutowej ischemii oraz 1- i 96-godzinnej reperfuzji	52
Ryc. 10 Wzrost immunoreaktywności PKC β II obserwowany jest głównie w mitochondriach w części CA2-4, DG hipokampa zwierząt poddanych 5-minutowej ischemii oraz 1- lub 96-godzinnej reperfuzji.....	53
Ryc. 11 Mikrografie elektronowe ilustrujące lokalizację PKC β II w mitochondriach.....	54
Ryc. 12 Inhibitor β IIV5-3 hamuje translokację PKC β II do frakcji błonowej wzbogaconej w mitochondria.	55
Ryc. 13 Inhibitor β IIV5-3 zmniejsza poischemiczną immunoreaktywność PKC β II w mitochondriach.....	56
Ryc. 14 Po epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym PKC β II lokalizuje się w macierzy mitochondrialnej.....	57
Ryc. 15 PKC β II obecna w mitochondriach jest aktywna enzymatycznie.	59
Ryc. 16 Inhibitor PKC β (257879-35-9) pogłębia uszkodzenie zainicjowane przez 100 μ M NMDA.....	60
Ryc. 17 Inhibitor β IIV5-3 pogłębia uszkodzenie skrawków hipokampa szczura wywołane przez NMDA.....	61
Ryc. 18 Inhibitor β IIV5-3 pogłębia rozległość uszkodzenia wywołanego krótkotrwałym niedokrwieniem mózgu myszokoczka.	63
Ryc. 19 Inhibitor PKC β II pogłębia proces apoptozy wywołanej krótkotrwałym niedokrwieniem mózgu myszokoczka.....	64
Ryc. 20 Ilość i aktywność dehydrogenazy pirogronianowej (PDH).....	68
Ryc. 21 Względna aktywność specyficzna PDH.....	68
Ryc. 22 Ilość i aktywność syntazy ATP.....	69
Ryc. 23 Względna aktywność specyficzna syntazy ATP.....	70
Ryc. 24 Wizualizacja analizy czynników głównych (PCA) dla wyników analizy GC-MS.	71
Ryc. 25 Wizualizacja analizy ortogonalnej częściowych największych kwadratów (OPLS)	72
Ryc. 26 Wizualizacja analizy częściowych największych kwadratów (PLS) dla wyników analizy GC-MS.....	72
Ryc. 27 Ilości wybranych metabolitów wyrażone jako średnie wartości intensywności sygnału mierzonego metodą GC-MS.....	76
Ryc. 28 Zawartość metabolitów cyklu kwasu cytrynowego w mitochondriach regionów CA1 i CA2-4, DG hipokampa po jednogodzinnej reperfuzji (I/R 1h + NaCl).....	77
Ryc. 29 Porównanie zawartości metabolitów cyklu kwasu cytrynowego w mitochondriach regionów CA1 i CA2-4, DG hipokampa po jednogodzinnej reperfuzji (I/R 1h + NaCl) i po podaniu inhibitora (I/R 1h+ β IIV5-3).....	77

11.3 Spis tabel

Tabela 1 Odczynniki i materiały stosowane w doświadczeniach	32
Tabela 2 Składy używanych roztworów i pożywek	33

Tabela 3 Wyniki analizy czystości frakcji mitochondrialnej. Immunodetekcja wybranych białek we frakcjach błonowej (P2), cytosolowej (S2) i mitochondrialnej (MT).....	37
Tabela 4 Lista przeciwciał używanych w doświadczeniach.....	38
Tabela 5 Przewidywanie występowania presekwencji kierującej do mitochondriów w białku PKC β II. Na podstawie wyników z programu MitoFate.....	58
Tabela 6 Białka mitochondrialne, z którymi może oddziaływać PKC β II, wytypowane metodami chromatografii powinowactwa i spektrometrii mas.....	65
Tabela 7 Zdjęcia western blot obrazujące wyniki koimmunoprecypitacji wybranych białek mitochondrialnych z PKC β II w regionie CA2-4, DG wyizolowanych po 1 godzinie reperfuzji od 5 minutowego niedokrwienia mózgu myszokoczka.	66
Tabela 8 Zawartość metabolitów w mitochondriach wyizolowanych z regionów CA1 i CA2-4, DG hipokampów z grupy kontrolnej.	73