

# AUTOREFERAT

## PAWEŁ MAREK MAJEWSKI

### **Jednostka organizacyjna wyznaczona do przeprowadzenia postępowania habilitacyjnego:**

Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego  
Ul. Miecznikowa 1,  
02-096 Warszawa

### **Spis Treści**

<b>I. Informacje o wykształceniu i przebiegu zatrudnienia</b>	2
<b>II. Wskazanie osiągnięcia naukowego</b>	3
a) Tytuł osiągnięcia naukowego	3
b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	3
c) Omówienie celu naukowego prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego oraz wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania (Autoreferat)	3
d) Spis literatury	18
<b>III. Dorobek naukowy</b>	20
a) Dorobek naukowy po doktoracie	20
b) Dorobek naukowy przed obroną doktoratu	24

**I. Informacje o wykształceniu i przebiegu zatrudnienia**

- a) **doktor nauk biologicznych** w zakresie biologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, data uzyskania 04.10.2004  
tytuł rozprawy: Udział melatoniny w regulacji stanu zapalnego otrzewnej samców *Gallus domesticus* L.  
promotor: Prof. dr hab. Krystyna Skwarło-Sońta, Zakład Fizjologii Zwierząt Kręgowych, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
recenzent: Prof. dr hab. Barbara Płytycz, Zakład Immunologii Ewolucyjnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Prof. Grażyna Korczak-Kowalska, Zakład Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
- b) **magister biologii**, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, data uzyskania 02.07.1999  
tytuł pracy: Wpływ morfiny na indukowany tioglikolatem stan zapalny otrzewnej kury domowej (*Gallus domesticus* L.)  
promotor: Prof. dr hab. Krystyna Skwarło-Sońta, Zakład Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
recenzenci: Prof. dr hab. Bronisław Cymborowski, Zakład Fizjologii Bezkręgowców, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
- c) Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych
- |                   |                     |                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 01.2006 – obecnie | adiunkt             | <b>Zakład Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski</b> , (Zakład Fizjologii Zwierząt powstał w 2005 roku w wyniku połączenia Zakładu Fizjologii Bezkręgowców i Zakładu Fizjologii Zwierząt Kręgowych) |
| 12.2007 – 11.2009 | staż<br>podoktorski | <i>Department of Pediatrics, Steele Children's Research Center, University of Arizona Health Sciences Center, Tucson, Arizona, USA</i>                                                                                     |
| 11.2004 – 12.2005 | adiunkt             | Zakład Fizjologii Zwierząt Kręgowych, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,                                                                                                                                            |
| 10.2004           | asystent            | Zakład Fizjologii Zwierząt Kręgowych, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,                                                                                                                                            |

**II. Wskazanie osiągnięcia<sup>1\*</sup>** wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm. późn.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego

**Określenie udziału układu odpornościowego w regulacji aktywności osteoblastów gryzoni laboratoryjnych oraz pinealocytów kury domowej**

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

1. **Majewski PM**, Thurston RD, Ramalingam R, Kiela PR, Ghishan FK. Cooperative role of NF- $\kappa$ B and Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in the TNF-induced inhibition of Phex expression in osteoblasts. (2010) Journal of Biological Chemistry 285(45):34828-34538
2. Piesiewicz A, Kędzierska U, Podobas E, Adamska I, Zuzewicz K, **Majewski PM**. Season-dependent Postembryonic Maturation of the Diurnal Rhythm of Melatonin Biosynthesis in the Chicken Pineal Gland. (2012) Chronobiology International 29(9): 1227-1238
3. Piesiewicz A, Kędzierska U, Adamska I, Usarek M, Zeman M, Skwarło-Sońta K, **Majewski PM**. Pineal arylalkylamine N-acetyl-transferase (Aanat) gene expression as a target of inflammatory mediators in the chicken. (2012) General and Comparative Endocrinology 179(2):143-151
4. Piesiewicz A, Kędzierska U, Turkowska E, Adamska I, **Majewski PM**. Seasonal postembryonic maturation of the diurnal rhythm of serotonin in the chicken pineal gland. (2015) Chronobiology International 32(1):59-70

*Omówienie indywidualnego wkładu wnioskodawcy oraz oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład w powstanie każdej z powyższych prac zebrano w osobnym dokumencie (Załącznik 7). Nie przewiduje się wykorzystania którejkolwiek z wymienionych prac jako osiągnięcia w innym postępowaniu awansowym.*

c) Omówienie celu naukowego prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego oraz wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Badania zaprezentowane w serii publikacji są kontynuacją mojej pracy nad wzajemnymi oddziaływaniami pomiędzy układami nerwowym, hormonalnym i odpornościowym u zwierząt

<sup>1\*</sup> w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie.

kręgowych, które rozwijają się od studiów doktoranckich. Podstawową różnicą, pomiędzy wymienionym okresem, a pracą po uzyskaniu stopnia doktora jest zmiana podejścia do badań i zastosowanie w nich metod biologii molekularnej oraz analiz chronobiologicznych. Do rozwoju moich badań w znaczący sposób przyczyniła się praca podczas stażu podoktorskiego na *University of Arizona*, która zwróciła moją uwagę na tkankę kostną, od niedawna uznawaną za istotny element układu hormonalnego (Fukumoto i Martin, 2009). Zdobyte doświadczenie widoczne jest zarówno w publikacjach, jak również w obecnej pracy, której efekty zostały szczegółowo opisane w podrozdziałach zatytułowanych „Perspektywy”. Badania przedstawione w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego były przeprowadzone głównie na gryzoniach laboratoryjnych oraz kurczętach: zwierzętach modelowych dla gromad ssaków i ptaków. Część moich obserwacji naukowych przeprowadzonych w modelu ssaczym jest obecnie porównywana z wynikami badań, które prowadzę na komórkach ludzkich.

### **Określenie udziału układu odpornościowego w regulacji aktywności osteoblastów gryzoni laboratoryjnych**

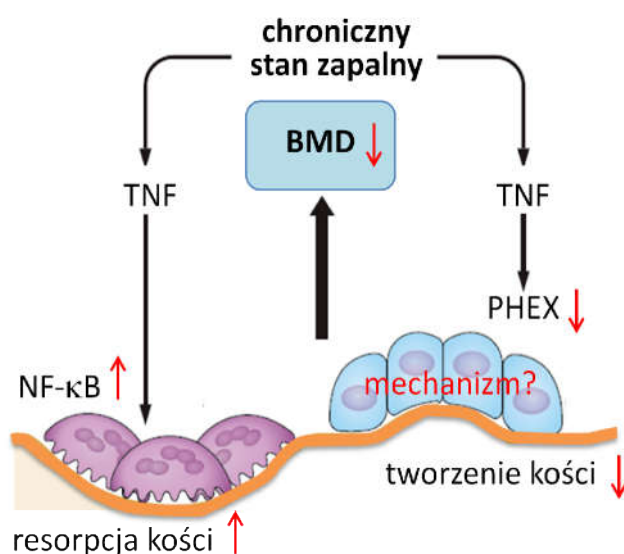
---

**Majewski PM**, Thurston RD, Ramalingam R, Kiela PR, Ghishan FK (2010) Cooperative role of NF- $\kappa$ B and Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in the TNF-induced inhibition of PheX expression in osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry* **285(45)**: 34828-34538

---

**Wprowadzenie:** Zmniejszenie gęstości mineralnej kości (*bone mineral density*, BMD) jest częstym zjawiskiem towarzyszącym przewlekłym stanom zapalnym, w tym nieswoistemu zapaleniu jelit (*inflammatory bowel disease*, IBD). Choroba ta często prowadzi do zależnej od chronicznego stanu zapalnego osteoporozy. Dane literaturowe wskazują, że zarówno osteoporoza spowodowana obniżeniem poziomu hormonów płciowych, estrogenów, jak i ta wywołana przez nadaktywność układu odpornościowego, ma źródło we wzroście aktywności czynników z rodziny NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-lightchain-enhancer of activated B cells*, NF- $\kappa$ B). Czynniki te są elementem bardzo ważnej wewnątrzkomórkowej ścieżki sygnałowej, aktywowanej nie tylko w osteoklastach, odpowiedzialnych za resorpcję, czy w osteoblastach odpowiedzialnych za budowę kości, ale również w wielu innych komórkach. Ostatnie lata przynoszą dużo nowych informacji dotyczących znaczenia kości w homeostazie organizmu, wskazując iż pełnią one m. in. aktywną funkcję w homeostazie wapnia i fosforu nieorganicznego ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Pi}$ ). Odkrycie przyczyn powstawania związanej z chromosomem X krzywicy hipofosfatemicznej (*X-linked hypophosphatemia*, XLH), wywoływanej przez mutację genu kodującego białko PHEX, sprawiło,

że wiedza o funkcjonowaniu osi regulacyjnej nerki-kości-jelito jest lepiej rozumiana. Gen *Phex* koduje endopeptydazę regulującą poziom fosforanów nieorganicznych (*Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked, PHEX*). Badania przeprowadzone przez grupę Profesora Feyeza Ghishana zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* wykazały, że podczas chronicznego stanu zapalnego zarówno w modelach zwierzęcych IBD, jak i u ludzi z tą chorobą, krążące limfocyty oraz inne leukocyty uwalniają cytokiny wpływające na homeostazę kości, zaburzając równowagę pomiędzy odkładaniem, a resorpcją składników mineralnych (Uno i wsp., 2006). Ponadto, obniżona BMD jest często obserwowana u pacjentów z IBD, 31-59% dorosłych cierpiących na tę chorobę ma osteopenię, podczas gdy 5-41% ma osteoporozę, a u większości młodych pacjentów z IBD występuje znaczny ubytek BMD (Rodriguez-Bores i wsp., 2007). Wczesne badania (Uno i wsp., 2006), wykonane na myszach z chemicznie wywołanym zapaleniem okrężnicy (model TNBS) lub otrzymujących dootrzewnowo cytokinę prozapalną TNF (*tumour necrosis factor, TNF*) wykazały, że w ich tkance kostnej poziom mRNA genu *Phex* jest obniżony, a regulacja ekspresji tego genu zachodzi na poziomie transkrypcyjnym. Co więcej, ci sami autorzy zidentyfikowali region promotora mysiego genu *Phex* usytuowany bardzo blisko miejsca startu transkrypcji, pomiędzy 116 a 110 nukleotydem (-116/-110 nt) od miejsca startu transkrypcji (określany zwyczajowo jako +1 nt) warunkującego wywoływane przez TNF hamowanie ekspresji *Phex*. Obniżona przez tę cytokinę ekspresja *Phex*, skutkuje zahamowaniem mineralizacji, co stwierdzono w badaniach prowadzonych na szczurzej osteoblastycznej linii komórkowej UMR-106. Wyniki te wskazują, że zahamowanie aktywności osteoblastów może przyczyniać się do spadku BMD obserwowanej podczas przewlekłych stanów zapalnych (Ryc. 1).



Ryc. 1 Wpływ chronicznego stanu zapalnego na strukturę kości, obserwowany na poziomie aktywności osteoklastów i osteoblastów, zmienionej przez główną cytokinę prozapalną TNF. Efektem działania TNF jest obniżenie gęstości mineralnej kości (BMD).

**Cel badań:** określenie molekularnego mechanizmu, zaangażowanego w zależne od TNF hamownie ekspresji genu *Phex* w osteoblastach.

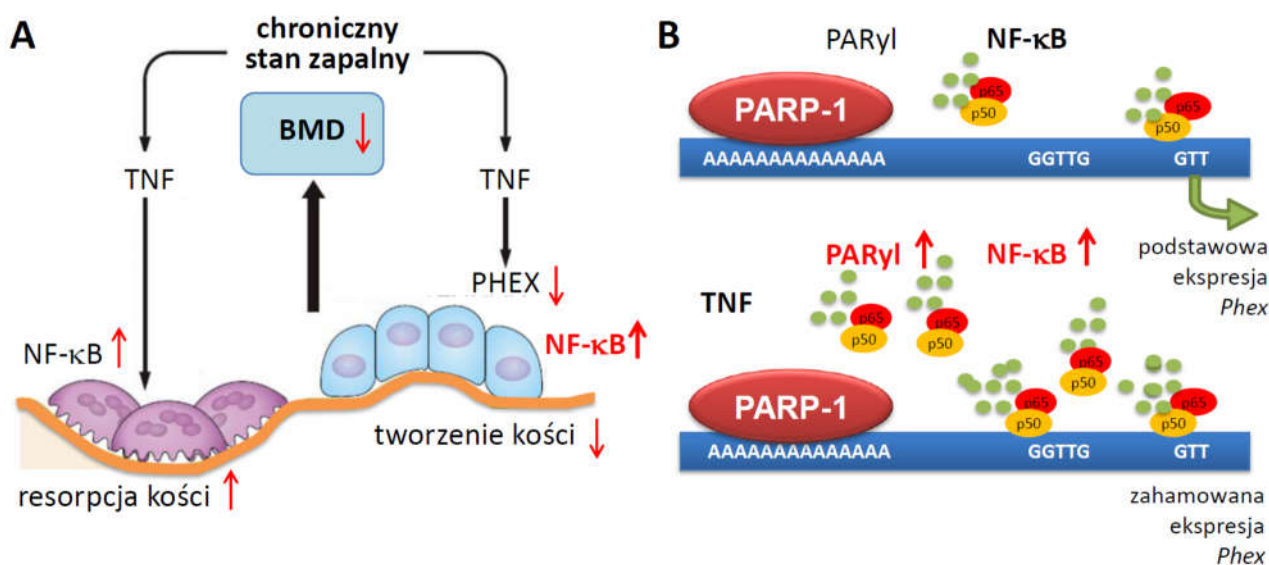
**Metody:** Doświadczenia zostały wykonane na szczurzej osteoblastycznej linii komórkowej UMR-106. Analizowany był poziom mRNA genu *Phex* metodą RT-qPCR. Ponadto, sklonowano mysie promotor genu *Phex* i stworzono system reporterowy (p $\beta$ Gal, Clontech) zawierający różne fragmenty promotora tego genu, którym transferowano komórki UMR-106. Interakcje DNA-białka jądrowe wykonywano techniką EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*), DAPA (*DNA affinity precipitation assay*) oraz CHIP (*chromatin immunoprecipitation assay*). W celu potwierdzenia wyników uzyskanych w badaniach *in vitro* przeprowadzono szereg doświadczeń na:

- myszach dzikich (*wild type*, WT),
- szczepie myszy z inaktywowanym genem kodującym białko PARP-1 (KO PARP-1<sup>-/-</sup>),
- mysim modelu choroby IBD, szczepie myszy z inaktywowanym genem kodującym Interleukinę-10 (KO IL-10<sup>-/-</sup>),
- mysim modelu choroby IBD, indukowanej dootrzewnowym podaniem limfocytów CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> myszom z inaktywowanym genem Rag2 (KO Rag2<sup>-/-</sup>).

**Wyniki:** Wykonane doświadczenia potwierdziły hamujący wpływ TNF na ekspresję genu *Phex* w komórkach UMR-106. Podanie cykloheksamidu, inhibitora translacji, nie odwracało efektu wywieranego przez TNF, co sugeruje, że we wpływie tej cytokiny nie pośredniczą czynniki transkrypcyjne, powstające w komórkach *de novo*. Transfekcja komórek UMR-106 plazmidami zawierającymi coraz krótsze odcinki mysiego promotora genu *Phex* pozwoliła na zidentyfikowanie w nim kilku miejsc zlokalizowanych blisko miejsca startu transkrypcji, potencjalnie wiążących czynniki transkrypcyjne NF- $\kappa$ B i AP-1 (*activator protein 1*). Doświadczenia wykonane techniką EMSA wykazały, że spośród tych dwóch rodzajów czynników transkrypcyjnych, wiązanie do promotora *Phex* pod wpływem TNF było zwiększone dla białek szlaku NF- $\kappa$ B. Metodą DAPA potwierdzono, że rejon promotora *Phex* -133/+1 nt wiąże czynniki NF- $\kappa$ B. Co więcej wykazano, że region promotora *Phex* -116/-110 nt, zawierający liczne nukleotydy adeninowe (polyA) uczestniczy w wywoływaniu przez TNF hamowaniu ekspresji tego genu, przez łączące się z nim białko PARP-1 i stymulację jego aktywności enzymatycznej wyrażającej się poli ADP-rybozylacją (PARyl) czynników NF- $\kappa$ B (posttranslacyjna modyfikacja białek) łączących się z promotorem w regionie 76/-56 nt oraz -35/-16 nt promotora genu *Phex*. Zarówno PARP-1, jak i czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B (heterodimer RelA/p50), wiążą się z promotorem *Phex* bardzo blisko miejsca startu transkrypcji, a białko RelA (synonim: p65) podlega PARylacji. Zahamowanie enzymatycznej aktywności PARP-1 odwraca hamujący ekspresję *Phex* wpływ TNF. Jednym z końcowych doświadczeń

potwierdzających rolę czynników ścieżki sygnałowej NF- $\kappa$ B oraz białka PARP-1 w hamowaniu ekspresji *Phex* było poddanie myszy dzikich (WT) oraz KO PARP-1<sup>-/-</sup> wpływowi TNF. Iniekcja tej cytokiny myszom, powodowała znaczne obniżenie poziomu mRNA genu *Phex* w tkance kostnej, podczas gdy zwierzęta PARP-1<sup>-/-</sup> poddane wpływowi TNF nie różniły się pod tym względem od zwierząt kontrolnych PARP-1<sup>-/-</sup> nastrzykniętych solą fizjologiczną. Badania mechanizmu hamowania ekspresji *Phex* u gryzoni laboratoryjnych, potwierdziły represję *Phex* w kolejnych dwóch modelach chronicznego zapalenia jelit u myszy (mysie modele choroby IBD), zapalenia okrężnicy indukowanego przez mikroflorę bakteryjną u myszy KO IL-10<sup>-/-</sup> oraz indukowanego dootrzewnowym podaniem limfocytów CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> myszom KO Rag2<sup>-/-</sup>.

**Podsumowanie:** Przytoczone wyniki wskazują na istnienie u gryzoni laboratoryjnych mechanizmu represji genów zachodzącej pod wpływem cytokiny prozapalnej TNF, w której uczestniczą czynniki transkrypcyjne NF- $\kappa$ B i białka PARP-1. To zjawisko przypuszczalnie przyczynia się do obniżania BMD obserwowanego podczas chronicznych stanów zapalnych, takich jak IBD. Sugerowany mechanizm zależnego od TNF hamowania ekspresji *Phex* u gryzoni laboratoryjnych został podsumowany na Ryc. 2. Białko PARP-1 uznawane jest na poziomie regulacji transkrypcji genów jako „cyngiel” rozwoju reakcji zapalnej (Hassa i Hottiger, 2002), zatem jest możliwe, że regiony PoliA zlokalizowane blisko miejsca startu transkrypcji w promotorach innych genów mogą być ważnym elementem regulacyjnym podczas aktywacji układu odpornościowego, takiego jak przewlekły stan zapalny.



Ryc. 2 Wpływ chronicznego stanu zapalnego na strukturę kości, obserwowany na poziomie aktywności osteoklastów i osteoblastów (A) oraz sugerowany mechanizm represji genu *Phex* pod wpływem TNF (B).

**Perspektywy:** Badania wykonane na modelu zwierzęcym stały się podstawą do stworzenia nowego projektu badawczego, którego celem jest weryfikacja czy podobny mechanizm istnieje w przypadku regulacji ludzkiego genu *Phex*. W 2011 roku stworzony przeze mnie projekt pt.: "Udział posttranslacyjnej modyfikacji czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B w powstawaniu osteoporozy - badania *in vitro* z zastosowaniem osteoblastów ludzkich" otrzymał finansowanie z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Grant: N 401 629140).

W wyniku przeprowadzonych w ramach tego projektu badań stwierdzono:

- istotny udział genu *Phex* w regulacji funkcji osteoblastów ludzkich przez TNF, zależny od aktywności ścieżki sygnałowej NF- $\kappa$ B,
- brak modulującego znaczenia białka PARP-1 na funkcje osteoblastów ludzkich po podaniu TNF,
- istnienie molekularnego mechanizmu regulacji ekspresji genów, w którym uczestniczą regiony poliA w proksymalnej części promotorów genów.

Badania te będą kontynuowane w celu dalszego scharakteryzowania opisanego mechanizmu angażującego rejony polyA genów, których ekspresja jest zmieniana podczas aktywacji układu odpornościowego.

### **Określenie udziału układu odpornościowego w regulacji aktywności pinealocytów kury domowej**

Szyszynka jest narządem neuroendokrynnym występującym jedynie u zwierząt kręgowych. Zaangażowana jest ona w kontrolę i synchronizację funkcji rozrodczych i sezonowości wielu procesów, włączając w to metabolizm i procesy odpornościowe, a u ptaków kontroluje ona również migrację oraz śpiew. Szyszynka oddziałuje na organizm poprzez syntezę głównego hormonu, melatoniny (Falcon, 2007). Melatonina (MEL) syntetyzowana nocą jest z szyszynki niezwłocznie uwalniana do płynu mózgowo-rdzeniowego i trafia do krwi, z którą krąży w organizmie będąc dla niego chemicznym sygnałem o zapadnięciu ciemności, zależnie od profilu dobowej aktywności zwierzęcia, wskazując porę jego aktywności lub spoczynku. Istnieje wiele dowodów wskazujących na występowanie wzajemnego oddziaływania pomiędzy układem odpornościowym, a syntetyzującą MEL szyszynką (Skwarło-Sońta i wsp., 2003, 2007, 2011, Majewski i wsp. 2005a, Nowak i wsp., 2006, Piesiewicz i wsp., 2012), ale szczegółowy mechanizm tej relacji nadal jest nie w pełni rozumiany. Zgodnie z otrzymanymi wynikami badań własnych, wskazującymi na występowanie sezonowych zmian w aktywności biosyntetycznej szyszynki oraz różnic we wpływie aktywowanego doświadczalnie układu odpornościowego na aktywność tego narządu, u ptaków



przetrzymany od dnia wyklucia w takich samych kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, zostały przeprowadzone badania w celu:

- określenia, co jest przyczyną otrzymywania niejednoznacznych i często sprzecznych wyników badań przez naukowców z różnych laboratoriów,
- zdefiniowania, który sezon oraz wiek ptaków jest najodpowiedniejszy do badania interakcji pomiędzy szyszynką, a układem odpornościowym.

Osiągnięcie tych celów było niezbędne do wykonania ostatniego etapu badań będących moim osiągnięciem naukowym.

---

Piesiewicz A, Kędzierska U, Podobas E, Adamska I, Zuzewicz K, **Majewski PM** (2012) Season-dependent postembryonic maturation of the diurnal rhythm of melatonin biosynthesis in the chicken pineal gland. *Chronobiology International* **29(9)**: 1227-1238

---

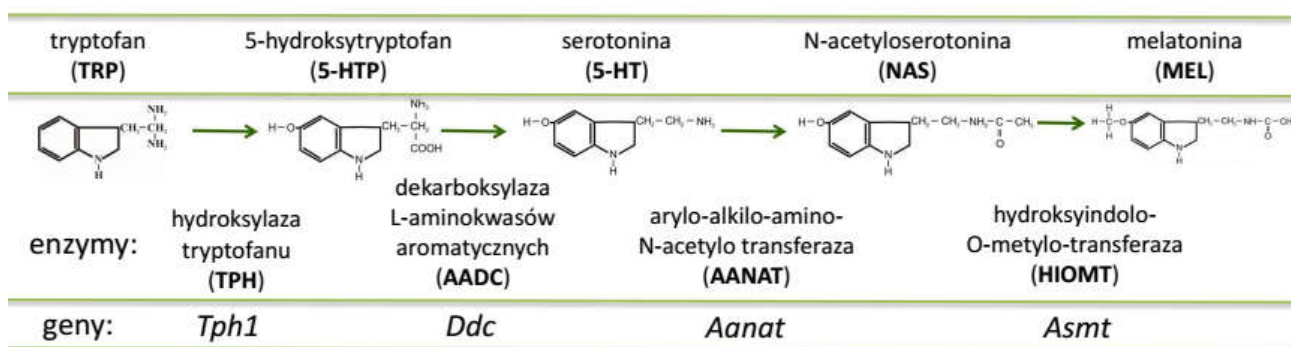
Piesiewicz A, Kędzierska U, Turkowska E, Adamska I, **Majewski PM** (2015) Seasonal postembryonic maturation of the diurnal rhythm of serotonin in the chicken pineal gland. *Chronobiology International* **32(1)**: 59-70

---

**Wprowadzenie do dwóch publikacji:** Rytm biologiczny, to znaczy dobowe zmiany parametrów biologicznych, występują u niemal wszystkich przebadanych dotychczas żywych organizmów (Dunlap i wsp., 1999, Golden & Canales, 2003, Schibler, 2005). Prawie wszystkie zmiany okołodobowe, nazywane również rytmami dobowymi, są generowane przez endogenne oscylatory które wykazują około 24 h oscylacje, nawet gdy organizm przebywa w stałych warunkach świetlnych, zazwyczaj w stałej ciemności (D:D). Te endogenne oscylacje są zwrotnie synchronizowane lub dostosowywane do czasu rzeczywistego będącego dawcą czasu (ZT, *Zeitgeber time*), tak więc ich endogenna faza rytmu stabilnie odpowiada fazie rytmu otoczenia. Dominującym dawcą czasu (ZT) dla większości gatunków jest cykl światła i ciemności (L:D), a wyspecjalizowane fotorecepcyjne oraz fototransdukcyjne mechanizmy wyewoluowały w system zegara biologicznego. Dostosowany do czasu rzeczywistego oscylator lub grupa oscylatorów regulują różne podległe im procesy, nadając rytmiczne właściwości całemu organizmowi. Na poziomie komórek rytm dobowy regulowany jest przez geny zegarowe i zwrotne pętle transkrypcyjno - translacyjne (Dunlap i wsp., 1999). U ptaków nadrzędne centra regulacyjne zlokalizowane są w trzech wyspecjalizowanych strukturach: szyszynce, siatkówce oka i jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza (SCN) (Cassone, 1998). Szyszynka syntetyzuje MEL rytmicznie podczas cyklu L:D, ze szczytem w ciągu nocy i z relatywnie niskim podstawowym poziomem obserwowanym w ciągu dnia. Hormon ten nie jest przechowywany w szyszynce, ale

niezwłocznie uwalniany do krążenia obwodowego i dlatego zmiany jego stężenia w organizmie korespondują ze wzrostem jego syntezy w szyszynce. Konsekwentnie, MEL przekazuje informacje o zewnętrznych warunkach świetlnych oraz aktywności oscylatora centralnego (Barclay i wsp., 2012). Stwierdzono, że u kury domowej szyszynka bezpośrednio otrzymuje informacje o warunkach świetlnych otoczenia i odpowiada na ten sygnał. Co więcej, wyniki kilku prac badawczych wskazują, że szyszynkowy molekularny mechanizm zegarowy występujący u ptaków jest identyczny z tym występującym w SCN ssaków (Okano & Fukada, 2003, Yoshimura i wsp., 2000). Właściwości te czynią szyszynkę kurcząt bardzo dogodnym modelem do badań biologicznego systemu zegarowego.

Biosynteza MEL jest dobrze poznanym, czteroetapowym szlakiem enzymatycznym. Na pierwszym etapie tryptofan (TRP) jest przekształcany do 5-hydroksytryptofanu (5-HTP) przez hydroksylazę tryptofanu (TPH), enzym kodowany przez gen *Tph1*. Następnym enzymem szlaku jest dekarboksylaza L-aminokwasów aromatycznych (AADC), kodowana przez gen *Ddc*, przekształcająca 5-HTP do 5-hydroksytryptaminy (serotonina, 5-HT). Serotonina jest substratem dla arylo-alkilo-amino-N-acetylotransferazy serotoninowej (AANAT) kodowanej przez gen *Aanat*, a produktem aktywności tego enzymu jest N-acetyloserotonina (NAS). Ostatnim etapem jest przekształcenie NAS do MEL przez transferazę hydroksyindolo-O-metylową (HIOMT), kodowaną u kury domowej przez gen *Asmt* (Klein i wsp., 2010). Szlak biosyntezy MEL ze wskazaniem substratów, enzymów i kodujących je genów u kury domowej został przedstawiony na Ryc. 3.



Ryc. 3 Szlak biosyntezy melatoniny ze wskazaniem substratów, nazw enzymów i kodujących je genów u kury domowej.

Molekularne szczegóły regulacji biosyntezy MEL różnią się pomiędzy różnymi gatunkami zwierząt (Cassone, 1998, Zeman & Herichova, 2011). Historycznie, uwaga badaczy skupiona była głównie na aktywności enzymu AANAT, który w latach 70-tych XX wieku został zaproponowany jako kluczowy enzym na szlaku biosyntezy MEL, co sprawiło, że jego właściwości były bardzo szeroko opisywane. Ponadto, wczesne badania wskazywały błędnie, że u ssaków HIOMT jest kluczowym enzymem na szlaku biosyntezy MEL i m. in. z tego powodu dwa pierwsze enzymy na szlaku

biosyntezy tego hormonu, TPH i AADC, nie doczekały się wzmożonego zainteresowania badaczy, choć pierwszy z nich został uznany za kluczowy na szlaku biosyntezy serotoniny (Huang i wsp., 2008). Dlatego nie dziwi to, że dotychczas nie przeprowadzono dokładnej analizy profilu transkrypcyjnego, występowania białek, substratów oraz produktów dla wszystkich enzymów biorących udział w szyszynkowej biosyntezie MEL. Zostało jednak odkryte, że u kury domowej przynajmniej trzy z czterech genów kodujących enzymy tego szlaku (*Tph1*, *Aanat* i *Asmt*) są pośrednio regulowane przez molekularny zegar biologiczny zlokalizowany w szyszynce oraz bezpośrednio przez światło, zarówno na poziomie transkrypcyjnym, translacyjnym jak i posttranslacyjnym (Cassone, 2014). Dlatego też uznaje się, że biosynteza MEL jest dynamicznym, rytmicznym procesem, podczas gdy jedynie ekspresja genu *Ddc* jest nierytmiczna.

Wcześniej doświadczeniach przeprowadzone przez nasz zespół na 3-tygodniowych kurczętach, trzymany od dnia wyklucia w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych (L:D 12:12), udowodniły że szczyt nocnej aktywności enzymu AANAT w szyszynkach jest przesunięty zależnie od sezonu wyklucia zwierząt (Majewski i wsp., 2005a). Następnie stwierdziliśmy zależny od rozwoju postembrionalnego wzrost aktywności tego enzymu u kurcząt wyklutych w sezonie letnim (Skwarło-Sońta i wsp., 2011). Odkrycia te skłoniły nas do postawienia hipotezy, że o ile rytmiczna synteza MEL zostaje ustalona podczas rozwoju embrionalnego ptaków, to profil rytmu jej biosyntezy jest modyfikowany przez sezon wyklucia oraz dojrzewa na wczesnym etapie postembrionalnym.

**Cel badań:** określenie wpływu sezonu wyklucia kurcząt na okołodobowe szyszynkowe zmiany biosyntezy MEL.

**Metody:** Doświadczenia przeprowadzono na kurczętach rasy Hy-Line wyklutych w lecie i w zimie, przetrzymywanych od dnia wyklucia w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych (L:D 12:12). 2-, 9- i 16-dniowe kurczęta były dekapitowane co 2 lub 4 h w ciągu doby i izolowano z nich szyszynki w celu określenia:

- dobowych zmian poziomu mRNA genów kodujących enzymy zaangażowane w szlak biosyntezy MEL (*Tph1*, *Ddc*, *Aanat* i *Asmt*), metodą RT-qPCR,
- dobowych zmian aktywności enzymów zaangażowanych w szlak biosyntezy MEL (AANAT i HIOMT), metodami biochemicznymi i HPLC,
- dobowych zmian poziomu MEL i dostępności substratów szlaku jej biosyntezy (TRP, 5-HTP and 5-HT), metodami biochemicznymi i HPLC.

**Wyniki:** Wyniki przedstawione w pierwszej pracy wskazują, że rytm dobowy biosyntezy MEL jest ustalony w 2. dniu po wykluciu kurcząt, lecz podlega zależnemu od sezonu dojrzewaniu

postembrionalnemu. Stężenie MEL i jej prekursora, serotoniny (5-HT), wzrasta pomiędzy 2. a 16. dniem życia kurcząt. Stwierdziliśmy również, że poziom mRNA genów *Aanat* i *Asmt* kodujących enzymy szlaku biosyntezy MEL z 5-HT, jak również aktywności samych enzymów, wzrastają podczas rozwoju postembrionalnego. Co więcej, zmiany były zależne od sezonu wyklucia zwierząt, mimo iż zwierzęta te od dnia wyklucia przetrzymywane były w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych (L:D 12:12). Najbardziej widoczne były różnice w stężeniu 5-HT i MEL, jak również w poziomie mRNA genu *Aanat* oraz aktywności kodowanego przez ten gen enzymu. Wykazaliśmy także, że największą zmiennością dobową charakteryzuje się 5-HT. Sugeruje to, iż dostępność tej indoloaminy może limitować biosyntezę MEL. Oznacza to, że na poziom biosyntezy MEL może istotnie wpływać poziom TRP i/lub 5-HTP, jak również aktywność TPH i AADC, enzymów biorących udział w przekształcaniu TRP do 5-HT.

Wyniki drugiej pracy wykazały, że zarówno poziom TRP i 5-HT, jak również poziom mRNA genów *Tph1* i *Ddc* w szyszynce zmienia się podczas rozwoju postembrionalnego w sposób zależny od wieku kurcząt i sezonu, natomiast poziom 5-HTP pozostaje na tym samym poziomie niezależnie od wieku zwierząt i sezonu prowadzenia badań. Odkrycie to jest kolejnym pośrednim dowodem na to, że wydajność zależnej od sezonu biosyntezy MEL jest limitowana przez dostępność 5-HT i ograniczenie to może zależeć zarówno od ekspresji genu *Tph1*, jak i *Ddc*. Ponadto, wykazaliśmy, że poziom mRNA genu *Ddc* w szyszynkach 9-dniowych kurcząt zmienia się rytmicznie w ciągu doby, pomimo, iż gen ten uważany jest za jedyny nie transkrybowany rytmicznie spośród wszystkich genów kodujących enzymy biorące udział w biosyntezie MEL u kury domowej. Najistotniejsze wnioski wynikające z dwóch przedstawionych prac, opisujących sezonowe i zależne od wieku kurcząt zmiany w procesie biosyntezy MEL, zostały podsumowane w Tabeli 1.

**Podsumowanie:** Przytoczone wyniki wskazują iż:

- rytmiczna aktywność biosyntetyczna szyszynki zmienia się podczas rozwoju postembrionalnego kurcząt,
- postembrionalne dojrzewanie rytmu biosyntetycznej aktywności szyszynki zależy od sezonu wyklucia,
- efektywność zależnej od sezonu biosyntezy MEL wydaje się być limitowana przez dostępność 5-HT,
- u kurcząt działa, opisywana wcześniej u gryzoni (Drickamer, 1990) „pamięć fotoperiodyczna”; zjawisko to definiuje się jako wpływ naturalnego fotoperiodu doświadczonego przez rodziców,
- widoczny okołodobowy rytm ekspresji genu *Ddc* u 9-dniowych kurcząt w lecie sugeruje, że podobnie do transkrypcji genów *Tph1*, *Aanat* i *Asmt*, gen ten może być kontrolowany przez

endogeny mechanizm zegara molekularny, a więc *Ddc* może być określony jako gen kontrolowany przez zegar (*clock controlled gene*, CCG).

Tabela 1. Rytmiczność biosyntezy MEL i jej prekursorów (TRP, 5-HTP, 5-HT), aktywności enzymów (AANAT, HIOMT) oraz zmian poziomu mRNA genów *Tph1*, *Ddc*, *Aanat* i *Asmt* w szyszynkach 2- i 9-dniowych kurcząt wykłutych w zimie i lecie. Krzyżykami oznaczono występowanie istotnych rytmicznych zmian ( $p < 0.05$  +,  $p < 0.025$  ++,  $p < 0.01$  +++,  $p < 0.001$  ++++), na podstawie Piesiewicz i wsp., 2015.

Mierzone parametry	2-dniowe		9-dniowe	
	Zima	Lato	Zima	Lato
TRP	-	-	+++	++++
<i>Tph1</i>	-	++	-	+
5-HTP	++	-	++	-
<i>Ddc</i>	-	-	-	+
5-HT	-	++++	+++	++++
<i>Aanat</i>	+++	+	+	++++
AANAT	++++	+++	+++	+++
<i>Asmt</i>	++++	+++	+++	+++
HIOMT	-	-	-	-
MEL	+++	+++	+++	+

**Perspektywy:** Wyniki opublikowanych doświadczeń pozwoliły na nowo spojrzeć na interakcje występujące pomiędzy szyszynką, a układem odpornościowym oraz na modyfikację stosowanego dotychczas układu eksperymentalnego. Co więcej, wyniki te stały się podstawą nowego projektu badawczego stworzonego w celu rozpoznania mechanizmu regulującego ekspresję genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy MEL i odpowiedzi na ogólne pytanie dotyczące regulacji ekspresji genów CCGs, których ekspresja kontrolowana jest przez elementy molekularnego zegara biologicznego. Ostatnio rozpoczęliśmy badania *in vitro* na pierwotnych pinealocytach wyizolowanych z szyszynki kurcząt, które wykazały, że geny kodujące wszystkie enzymy biorące udział w biosyntezie MEL można definiować jako CCGs (Marhelava i wsp., 2015 – materiały konferencyjne). Dodatkowo we współpracy z Profesorem Bogdanem Lewczukiem z Zakładu Histologii i Embriologii, Wydziału Weterynarii Medycznej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego określiliśmy dobowe zmiany poziomu wszystkich związków indolowych związanych z biosyntezą MEL, występujących w szyszynkach kurcząt. Badania te potwierdziły możliwość limitowania biosyntezy MEL przez dostępność 5-HT (Skwarło-Sońta i wsp., 2014 – materiały konferencyjne).

Dwa manuskrypty prezentujące przedstawione wyniki zostały ostatnio złożone do redakcji czasopism z listy *Journal Citation Reports*.

---

Piesiewicz A, Kędzierska U, Adamska I, Usarek M, Zeman M, Skwarło-Sońta K, **Majewski PM** (2012) Pineal arylalkylamine N-acetyl-transferase (Aanat) gene expression as a target of inflammatory mediators in the chicken. *General and Comparative Endocrinology* **179(2)**: 143-151

---

**Wprowadzenie:** Szesnaście lat temu nasza grupa odkryła, że immunizacja kurcząt erytrocytami owcy zmienia aktywność enzymu AANAT w szyszynkach w sposób zależny od sezonu i płci badanych zwierząt (Markowska i wsp., 2000). Stworzyliśmy wówczas dogodny układ doświadczalny do badań odpowiedzi zapalnej, bazujący na indukcji odpowiedzi immunologicznej przez dootrzewnowe podanie roztworu tioglikolatu (TG) (Majewski i wsp., 2002, Majewski i wsp., 2005b). U ptaków dootrzewnowy napływ leukocytów po iniekcji TG, głównie granulocytów, obserwowany jest już 3 - 4 h po iniekcji i kończy się po około 24 h, co jest znacznie dynamiczniejszym procesem, niż u badanych pod tym względem ssaków (Majewski i wsp., 2002). Ten krótki czas rozwoju reakcji zapalnej otrzewnej pozwolił nam na przeprowadzenie badań dobowej kontroli przebiegu reakcji zapalnej. Napływ leukocytów do otrzewnej kurcząt wiąże się ze wzrostem przepuszczalności naczyń krwionośnych jelitowej rozpoczynającym się około 4 h od podania TG (Majewski i wsp., 2002). Dootrzewnowe podanie roztworu buforu fosforanowego (PBS) zwierzętom kontrolnym również powoduje wzrost liczby leukocytów otrzewnowych (*peritoneal leukocytes*, PTLs), ale wzrost ten jest mniejszy i trwa krócej, niż ten obserwowany po dootrzewnowym zastrzyku TG. Wpływ podania TG jest nie tylko obserwowany lokalnie w otrzewnej, ale również obwodowo i wyraża się wzrostem liczby leukocytów we krwi, obserwowanym do 12 h od wywołania stanu zapalnego otrzewnej (Majewski i wsp., 2002) oraz w podwyższeniu, u zwierząt z wywołanym stanem zapalnym, zarówno spontanicznej jak i indukowanej podaniem mitogenu, aktywności proliferacyjnej limfocytów wyizolowanych ze śledzion (splenocytów) (Majewski i wsp., 2005b, Majewski i wsp., 2005a). Podstawowy oraz indukowany chemicznie poziom wolnych rodników tlenowych (*radical oxygen species*, ROS) oraz ich synteza jest wyższa w PTLs wyizolowanych od zwierząt z grupy TG, niż kontrolnej (Majewski i wsp., 2005a). Kształtującym kierunek dalszych badań odkryciem było stwierdzenie, że wywołująca stan zapalny otrzewnej iniekcja TG powoduje obniżenie aktywności enzymu AANAT w szyszynkach kurcząt (Skwarło-Sońta i wsp., 2003, Majewski i wsp., 2005a). Na podstawie przedstawionych wyników oraz dostępnych danych literaturowych, wysunęliśmy hipotezę istnienia wzajemnej komunikacji pomiędzy szyszynką a układem odpornościowym u ptaków (Skwarło-Sońta i wsp., 2003). Wszystkie opisane powyżej obserwacje znalazły swoje potwierdzenie

w badaniach przeprowadzonych na ssakach przez grupę Prof. Reginy Markus (Markus i wsp., 2007).

Mediatory stanu zapalnego u kurcząt jak dotychczas nie zostały dobrze scharakteryzowane. Ostatnio odkryliśmy jednak, że rozwojowi stanu zapalnego otrzewnej u kurcząt towarzyszy wzrost poziomu lizozymu w osoczu oraz zmiana poziomu mRNA prozapalnych cytokin: Interleukiny-6 i Interleukiny-18 w splenocytach. Co więcej, zmiany te również zależą od sezonu prowadzenia badań oraz pory doby, w której nastąpiło pobranie materiału do oznaczeń (Turkowska i wsp., 2016). Mechanizm szyszynkowej odpowiedzi na rozwój stanu zapalnego u kurcząt, włączając w to zaangażowanie receptorów oraz wewnątrzkomórkowych szlaków pośredniczących, nie został jeszcze określony lecz wciąż jest intensywnie badany. Obecnie, mechanizmy te są znacznie lepiej rozpoznane u ssaków. Nieliczne opublikowane w tym temacie prace doświadczalne wskazują na bezpośredni wpływ mediatorów zapalnych, uwalnianych przez komórki odpornościowe na pinealocyty, ale również na astrocyty, komórki mikrogleju oraz limfocyty obecne w szyszynkach. Zostało również wykazane, zarówno w badaniach *in vivo*, jak i *in vitro*, że antygeny takie jak lipopolisacharydy ścian komórkowych bakterii (LPS) mogą penetrować środowisko szyszynki, prawdopodobnie bezpośrednio aktywując ścieżkę sygnałową NF- $\kappa$ B w pinealocytach i komórkach mikrogleju przez receptory TLR4 (*toll-like receptor 4*). W komórkach mikrogleju LPS stymuluje biosyntezę i uwalnianie cytokiny TNF, która aktywuje ekspresję własnego receptora (TNFR1) w pinealocytach (da Silveira Cruz-Machado i wsp., 2010).

Możliwe są przynajmniej dwa mechanizmy modulacji szyszynkowej biosyntezy MEL przez stan zapalny otrzewnej, które mogą występować niezależnie lub jednocześnie:

- mediatory stanu zapalnego syntetyzowane podczas rozwoju reakcji zapalnej przedostają się do szyszynki i bezpośrednio wpływają na aktywność pinealocytów lub związanej z szyszynką tkanki limfoidalnej (*pineal-associated lymphoid tissue*, PALT),
- mediatory stanu zapalnego syntetyzowane podczas rozwoju reakcji zapalnej modulują uwalnianie neurotransmiterów przez komórki nerwowe unerwiające szyszynkę.

Przed rozpoznaniem czynnika lub czynników odpowiedzialnych za modulowanie aktywności szyszynki u kury domowej podczas rozwoju reakcji zapalnej niezwykle istotne było rozpoznanie, który element szlaku biosyntezy MEL podlega regulacji *in vivo*.

**Cel badań:** określenie etapu lub etapów szlaku biosyntezy MEL podlegających wpływowi stanu zapalnego.

**Metody:** Doświadczenia przeprowadzane były na kurczętach rasy Hy-Line przetrzymywanych od dnia wyklucia w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych (L:D 12:12). Stan zapalny otrzewnej wywoływany był przez dootrzewnową iniekcję roztworu thioglikolatu (TG) 2 h po zapaleniu lub 2 h przed wyłączeniem światła; zwierzęta dekapitowano 4 h od indukcji stanu zapalnego, a wpływ układu odpornościowego określany był w szyszynkach:

- na poziomie mRNA genów kodujących enzymy biorące udział w biosyntezie MEL (*Tph1*, *Ddc*, *Aanat* i *Asmt*), metodą RT-qPCR,
- na poziomie stężenia MEL oraz jej prekursorów (TRP, 5-HTP, 5-HT i NAS), metody biochemiczne i HPLC,
- na poziomie aktywności enzymów (TPH, AADC, AANAT i HIOMT), metody biochemiczne i HPLC,
- na poziomie pomiaru ilości białka AANAT oraz białka opiekuńczego 14-3-3, metoda *Western blot*,
- na poziomie stężenia MEL we krwi, metoda ELISA.

**Wyniki:** Wykazaliśmy, że rozwijający się stan zapalny powoduje wzrost poziomu mRNA genu *Tph1* nocą i wzrost poziomu mRNA genu *Asmt* w ciągu dnia oraz obniżenie poziomu transkrypcji genu *Aanat* nocą. Zarówno poziom MEL we krwi oraz szyszynkach, jak również szyszynkowy poziom NAS był obniżony w nocy u zwierząt z wywołanym stanem zapalnym. Poziom białka AANAT oraz jego aktywność enzymatyczna były znacząco zredukowane w szyszynkach kurcząt z grupy TG, podczas gdy aktywność enzymu HIOMT pozostawała podwyższona. Wyniki te wskazują, że obniżony poziom MEL obserwowany u zwierząt z wywołanym stanem zapalnym jest wynikiem regulacji ekspresji genu *Aanat* na poziomie transkrypcyjnym, poprzedzającym zahamowanie syntezy białka i aktywności tego enzymu. Definitywnie, można stwierdzić że na poziomie molekularnym celem działania nieznanymi jeszcze mediatorów stanu zapalnego w szyszynkach kurcząt jest gen kodujący enzym AANAT. Najważniejsze odkrycia z trzech publikacji prezentujących wyniki badań przeprowadzonych na kurczętach podsumowane zostały na Ryc. 4.

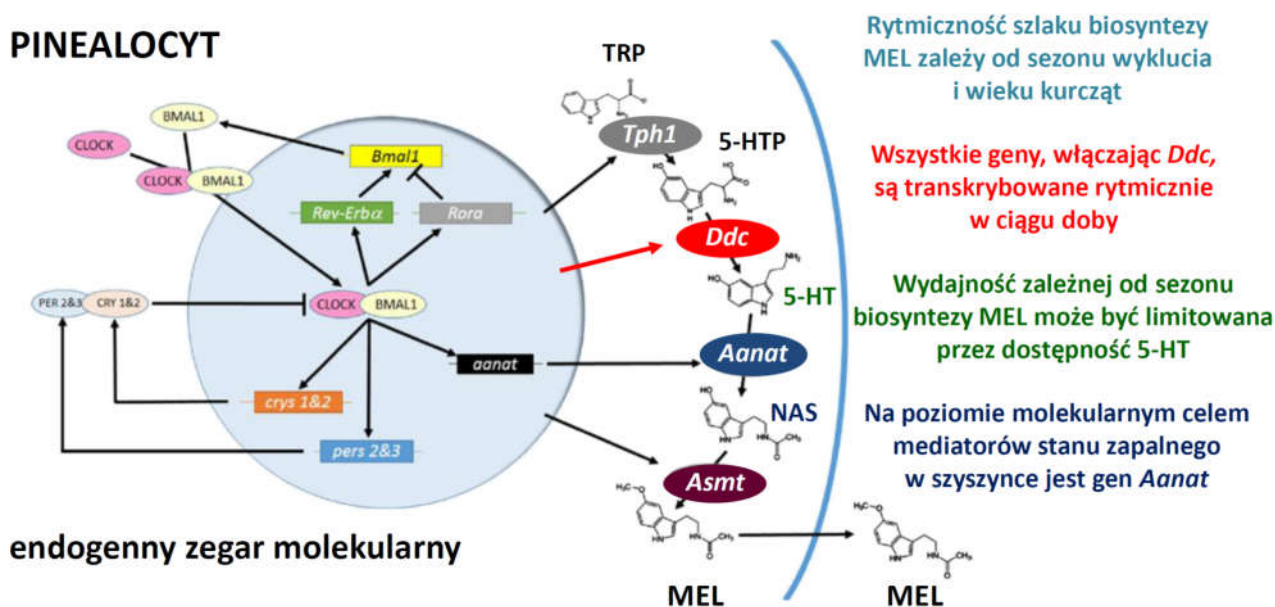
**Podsumowanie:** Rozwijający się stan zapalny u kurcząt hamuje szyszynkową biosyntezę MEL i redukuje poziom tego hormonu we krwi. Szyszynkowa ekspresja genu *Aanat* jest głównym celem mediatorów zapalnych, które nie zostały jeszcze zidentyfikowane u ptaków. Obniżenie poziomu biosyntezy MEL obserwowane podczas aktywacji układu odpornościowego jest wynikiem obniżenia ekspresji genu *Aanat* regulowanym na poziomie transkrypcyjnym.



**Perspektywy:** Otrzymane wyniki stały się podstawą przygotowania nowego projektu badań pt: „Neuroimmunologiczna regulacja syntezy melatoniny w szyszynce kury domowej” oraz uzyskania w 2013 roku jego finansowania ze środków Narodowego Centrum Naukowego (NCN UMO-2012/07/B/NZ3/02919). Celem tego projektu jest identyfikacja:

- neuroimmunologicznych czynników regulujących okołodobową aktywność biosyntetyczną szyszynki młodych kurcząt,
- neuroimmunologicznych czynników modulujących aktywność biosyntetyczną szyszynki podczas stanu zapalnego *in vitro*,
- weryfikacja działania czynników wybranych w doświadczeniach *in vivo* w układzie *in vitro* w szyszynkowych hodowlach organotypowych.

Ponadto, model *in vitro* hodowli kurczących pinealocytów pierwotnych, który ostatnio stworzyliśmy do badania czynników transkrypcyjnych regulujących biosyntezę MEL, w przyszłości może być przydatny w badaniach wzajemnych interakcji między szyszynką, a układem odpornościowym czy nerwowym. W przyszłości może on być również stosowany w przedklinicznym testowaniu nowych leków i terapii. Unieśmiertelnienie pinealocytów, które planujemy w najbliższym czasie, umożliwi utworzenie cennej linii komórkowej służącej do rozwoju dalszych badań. Dzięki temu uzyskiwane wyniki badań staną się bardziej powtarzalne. Pozwoli to również na ograniczenie liczby zwierząt używanych w doświadczeniach.



Ryc. 4 Schemat molekularnego zegara biologicznego regulującego biosyntezę melatoniny w pinealocytach ptaków ze wskazaniem najważniejszych odkryć wynikających z badań przeprowadzonych na kurczętach. Na podstawie Cassone, 2014, z modyfikacjami własnymi.

c) Spis literatury

1. Barclay JL, Tsang AH, Oster H (2012) Interaction of central and peripheral clocks in physiological regulation. *Progress in Brain Research* **199**: 163-81
2. Cassone VM (1998) Melatonin's role in vertebrate circadian rhythms. *Chronobiology International* **15**: 457-73
3. Cassone VM (2014) Avian circadian organization: a chorus of clocks. *Frontiers in Neuroendocrinology* **35**: 76-88
4. Challet E (2007) Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* **148**: 5648-55
5. da Silveira Cruz-Machado S, Carvalho-Sousa CE, Tamura EK, Pinato L, Cecon E, Fernandes PA, de Avellar MC, Ferreira ZS, Markus RP (2010) TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. *Journal of Pineal Research* **49**: 183-92
6. Drickamer LC (1990). Seasonal variation in fertility, fecundity and litter sex ratio in laboratory and wild stocks of house mice (*Mus domesticus*). *Laboratory Animal Science* **40**: 284-8.
7. Dunlap JC, Loros JJ, Liu Y, Crosthwaite SK (1999) Eukaryotic circadian systems: cycles in common. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **4**: 1-10
8. Falcon J (2007) Nocturnal melatonin synthesis: how to stop it. *Endocrinology* **148**: 1473-4
9. Fukumoto S, Martin TJ (2009) Bone as an endocrine organ. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **20**: 230-6
10. Golden SS, Canales SR (2003) Cyanobacterial circadian clocks--timing is everything. *Nature Reviews. Microbiology* **1**: 191-9
11. Hassa PO, Hottiger MO (2002) The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* **59**: 1534-53
12. Huang Z, Liu T, Chatteraj A, Ahmed S, Wang MM, Deng J, Sun X, Borjigin J (2008) Posttranslational regulation of TPH1 is responsible for the nightly surge of 5-HT output in the rat pineal gland. *Journal of Pineal Research* **45**: 506-14
13. Klein DC, Bailey MJ, Carter DA, Kim JS, Shi Q, Ho AK, Chik CL, Gaildrat P, Morin F, Ganguly S, Rath MF, Moller M, Sugden D, Rangel ZG, Munson PJ, Weller JL, Coon SL. (2010) Pineal function: impact of microarray analysis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **314**: 170-183
14. **Majewski P**, Adamska I, Pawlak J, Barańska A, Skwarło-Sońta K (2005a) Seasonality of pineal gland activity and immune functions in chickens. *Journal of Pineal Research* **39**: 66-72

15. **Majewski P**, Dziwiński T, Pawlak J, Waloch M, Skwarło-Sońta K (2005b) Anti-inflammatory and opioid-mediated effects of melatonin on experimental peritonitis in chickens. *Life Sciences* **76**: 1907-20
16. **Majewski P**, Markowska M, Laskowska H, Waloch M, Skwarło-Sońta K (2002) Effect of morphine on thioglycollate-induced peritonitis in chickens. *Neuro Endocrinology Letters* **23**: 161-7
17. Marhelava K, Kędzierska U, Adamska I, **Majewski PM** (2005) Ekspresja genów kodujących wszystkie enzymy szlaku biosyntezy melatoniny w szyszynce kury domowej jest kontrolowana przez zegar molekularny. IX Konferencja Adeptów Fizjologii, Gdańsk, Polska, 15-16 październik 2015, materiały konferencyjne
18. Markowska M, Bialecka B, Ciechanowska M, Koter Z, Laskowska H, Karkucinska-Wieckowska A, Skwarło-Sońta K. (2000) Effect of immunization on nocturnal NAT activity in chicken pineal gland. *Neuro Endocrinology Letters* **21**: 367-373
19. Markus RP, Ferreira ZS, Fernandes PA, Cecon E (2007) The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation* **14**: 126-33
20. Nowak K, **Majewski P**, Waloch M, Skwarło-Sońta K (2006) Season-related post-embryonic changes in the diurnal rhythm of AA-NAT activity in the chicken pineal gland. *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis, Zootechnica* **250(48)**: 17-23
21. Okano T, Fukada Y (2003) Chicktacking pineal clock. *Journal of Biochemistry* **134**: 791-7.
22. Piesiewicz A, Kędzierska U, Adamska I, Usarek M, Zeman M, Skwarło-Sońta K and **Majewski PM** (2012) Pineal arylalkylamine N-acetyl-transferase (Aanat) gene expression as a target of inflammatory mediators in the chicken. (2012) *General and Comparative Endocrinology* **179(2)**: 143-151
23. Piesiewicz A, Kędzierska U, Turkowska E, Adamska I, **Majewski PM** (2015) Seasonal postembryonic maturation of the diurnal rhythm of serotonin in the chicken pineal gland. *Chronobiology international* **32**: 59-70
24. Rodriguez-Bores L, Barahona-Garrido J, Yamamoto-Furusho JK (2007) Basic and clinical aspects of osteoporosis in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **13**: 6156-65
25. Schibler U (2005) The daily rhythms of genes, cells and organs. Biological clocks and circadian timing in cells. *EMBO reports* **6 Spec No**: S9-13
26. Skwarło-Sońta K, Majewski P, Markowska M, Obłap R, Olszańska B (2003) Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **81**: 342-9

27. Skwarło-Sońta K, **Majewski P**, Pawlak J, Markowska M (2007) Photoperiodic vs. non-photoperiodic animals – circadian and seasonal changes in immunity. In: Pandi-Perumal RS & Cardinali D, eds “*Melatonin: from molecules to therapy*”, Nova Science Publishers, Inc. New York, pp. 247-260
28. Skwarło-Sońta K, Nowak K, Joachimiak E, Podobas E, **Majewski P** (2011) Avian pineal gland as a clock and calendar: Season-related postmebryonic development of the melatonin biosynthesis circadian rhythm in chicken. In: Haldar C, Basu P, eds. *Treatise on photophysiology*. Imagination Editor & Printers: Varanasi U.P. India, pp. 153 – 166
29. Skwarło-Sońta K, Lewczuk B, Adamska I, Turkowska E, **Majewski PM** (2014) Biosynthesis of melatonin and related indoles in the chicken pineal gland over a daily cycle. Society for Experimental Biology Annual Meeting, Manchester, UK, 1 – 4 lipca 2014, Materiały konferencyjne
30. Turkowska E, Adamska I, Niedziolka S, **Majewski PM**, Skwarło-Sońta K (2016) Seasonality of inflammation in the chicken: clock vs. melatonin control over the pro-inflammatory cytokine gene transcription. *Biological Rhythm Research* **47(1)**:45-58
31. Uno JK, Kolek OI, Hines ER, Xu H, Timmermann BN, Kiela PR, Ghishan FK (2006) The role of tumor necrosis factor alpha in down-regulation of osteoblast Phex gene expression in experimental murine colitis. *Gastroenterology* **131**: 497-509
32. Yoshimura T, Suzuki Y, Makino E, Suzuki T, Kuroiwa A, Matsuda Y, Namikawa T, Ebihara S (2000). Molecular analysis of avian circadian clock genes. *Brain research. Molecular brain research* **78**: 207-15
33. Zeman M, Herichova I (2011) Circadian melatonin production develops faster in birds than in mammals. *General and comparative endocrinology* **172**: 23-30

### III. Dorobek naukowy

#### a) Dorobek naukowy po doktoracie

Jestem współautorem 18 oryginalnych prac naukowych oraz 3 prac przeglądowych, podsumowanie wspomnianych prac zostało przedstawione w sposób tematyczny.

---

Seria publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, przedstawiająca wstępne dane dotyczące sezonowych oraz zależnych od wieku różnic w szyszynkowej biosyntezie MEL u kurcząt.

- Skwarło-Sońta K, Nowak K, Joachimiak E, Podobas E, **Majewski P** (2011) Avian pineal gland as a clock and calendar: Season-related postmebryonic development of the melatonin biosynthesis

circadian rhythm in chicken, Ed. C. Haldar & P. Basu, Imagination Editor & Printers, Varanasi U.P. India, pp. 153-166

- Piesiewicz A, Podobas E, Kędzierska U, Joachimiak E, Markowska M, **Majewski P**, Skwarło-Sońta K (2010) Season-related differences in the biosynthetic activity of the neonatal chicken pineal gland. *The Open Ornithology Journal* 3(1): 134-140
- Nowak K, **Majewski P**, Waloch M, Skwarło-Sońta K (2006) Season-related post-embryonic changes in the diurnal rhythm of AA-NAT activity in the chicken pineal gland. *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis, Zootechnica* 250(48):17-23
- **Majewski P**, Adamska I, Pawlak J, Barańska A, Skwarło-Sońta K (2005) Seasonality of pineal gland activity and immune functions in chickens. *Journal of Pineal Research* 39(1):66-72

---

Seria publikacji przedstawiająca zależne od sezonu postembrionalne różnice w szyszynkowej biosyntezie MEL, zmiany w transkrypcji genów zegarowych w szyszynce oraz wpływu reakcji zapalnej na te parametry. Dwie z trzech prac są efektem współpracy z dr Seemą Rai z *Department of Zoology, School of Life Sciences, Guru Ghasidas Vishwavidyalaya, Bilaspur, Chhattisgarh, India*.

- Turkowska E, Adamska I, Niedziolka S, **Majewski PM**, Skwarło-Sońta K (2016) Seasonality of inflammation in the chicken: clock vs. melatonin control over the pro-inflammatory cytokine gene transcription. *Biological Rhythm Research* 47(1):45-58
- Turkowska E, **Majewski PM**, Rai S, Skwarło-Sońta K (2014) Pineal oscillator functioning in the chicken—effect of photoperiod and melatonin. *Chronobiology International* 31(1):134-143
- Turkowska E, Rai S, **Majewski PM**, Skwarło-Sońta K (2013) Diurnal and seasonal changes in IL-6 and IL-18 gene expression in blood leukocytes of male chickens with experimental peritonitis: the impact of lighting conditions and melatonin. *Journal of Animal and Feed Sciences* 22(2):79-87

---

Seria publikacji będąca efektem współpracy z Zakładem Mikrobiologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Prace opisują proces tworzenia szczepionek dla kur, przydatnych w ich komercyjnej hodowli.

- Kobierecka PA, Olech B, Książek M, Derlatka K, Adamska I, **Majewski PM**, Jagusztyn-Krynicka EK, Wyszynska AK (2016) Cell Wall Anchoring of the Campylobacter Antigens to Lactococcus lactis. *Frontiers in Microbiology* 18(7):165 eCollection 2016
- Lasica AM, Wyszynska A, Szymanek K, **Majewski P**, Jagusztyn-Krynicka EK (2010) Campylobacter protein oxidation influences epithelial cell invasion or intracellular survival as well as intestinal tract colonization in chickens. *Journal of Applied Genetics* 51(3):383-393

- Łaniewski P, Lis M, Wyszyńska A, **Majewski P**, Godlewska R, Jagusztyn-Krynicka EK. (2012) Assessment of chicken protection against *Campylobacter jejuni* infection by immunization with avirulent *Salmonella enterica* sv. Typhimurium strain producing *Campylobacter* CjaD/Pal protein. *Vaccine: Development and Therapy* 2: 43–50
- 

Seria publikacji, będąca efektem mojego zainteresowania naukowym zagadnieniem funkcji układu endogennych opioidów (*endogenous opioid system*, EOs). Jedna z prac powstała we współpracy z Zakładem Parazytologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Badania w niej przedstawione wskazują na udział EOs w rozwoju doświadczalnie wywołanego stanu zapalnego okrężnicy u myszy i wpływu zarażeniem pasożytami (*H. polygyrus*, stadium larwalne L4) na parametry odpornościowe oraz ekspresję receptorów opioidowych. Druga z prac wskazuje na wpływ EOs na biosyntezę MEL podczas stanu zapalnego otrzewnej u kurcząt. Wyniki ostatniej pracy wskazują, że inhalacja myszy olejkami z drzewa herbacianego modyfikuje, poprzez Eos, niektóre parametry odpornościowe u tego gatunku.

- Donskow-Łysoniewska K, **Majewski P**, Brodaczevska K, Jóźwicka K, Doligalska M (2012) *Heligmosmoides polygyrus* fourth stages induce protection against DSS- induced colitis and change opioid expression in the intestine. *Parasite Immunology* 34(11):536-546
  - **Majewski P**, Dziwiński T, Pawlak J, Waloch M, Skwarło-Sońta K (2005) Anti-inflammatory and opioid-mediated effects of melatonin on experimental peritonitis in chickens. *Life Sciences* 76(17):1907-1920
  - Gołąb M, Burdzenia O, **Majewski P**, Skwarło-Sońta K (2005) Tea tree oil inhalations modify the immunity in mice. *Journal of Applied Biomedicine* 3(2):101-108
- 

Seria publikacji będąca efektem współpracy z Instytutem Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu. Publikacje opisują znaczenie MEL w rozwoju embrionalnym ptaków.

- Skwarło-Sońta K, Oblap R, **Majewski P**, Stępińska U, Barańska A, Olszańska B (2008) Melatonin and its role in avian embryogenesis. In: *Experimental endocrinology and reproductive biology*, Eds. C Haldar, M Singaravel, SR Pandi-Perumal, DP Cardinali, Science Publishers, Enfield (NH), Jersey, Plymouth, pp. 171-186
  - Olszańska B, **Majewski P**, Lewczuk B, Stępińska U (2007) Melatonin and its synthesizing enzymes (arylalkylamine N-acetyltransferase-like and hydroxyindole-O-methyltransferase) in the avian eggs and early embryos. *Journal of Pineal Research* 42(3):310-318
-

---

Seria publikacji przedstawiająca dane dotyczące sezonowych oraz zależnych od płci różnic w aktywności układu odpornościowego zwierząt z poza gromady ptaków. Głównym wnioskiem z tych publikacji, poza opisaniem powyżej wspomnianych zależności jest to, że podanie MEL wydaje się wywierać raczej immunostymulujące niż przeciwzapalne właściwości u chomików syberyjskich, oraz, że lokalnie wywołany stan zapalny wpływa na narządy limfoidalne, nie wywierając takiego efektu na narządy immunologicznie uprzywilejowane.

- Pawlak J, Gołąb M, Markowska M, **Majewski P**, Skwarło-Sońta K (2009) Photoperiod-related changes in hormonal and immune status of male Siberian hamsters, *Phodopus sungorus*. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)* 152(3):299-303
- Pawlak J, **Majewski P**, Markowska M, Swarło-Sońta K (2005) Season- and gender- dependent changes in the immune function of Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Neuroendocrinology Letters* 26(1):55-60

---

Publikacja będąca efektem współpracy z *Department of Pediatrics, Steele Children's Research Center, University of Arizona Health Sciences Center, Tucson, Arizona*. Publikacja ta prezentuje wyniki badań dotyczących mechanizmów regulacji poziomu wapnia i fosforu nieorganicznego w mysim modelu nieswoistego zapalenia jelita (*inflammatory bowel disease, IBD*), prowadzącego do rozwoju osteopenii i osteoporozy. Głównym wnioskiem tej pracy jest to, że obniżenie ekspresji białka KLOTHO, nowo odkrytego receptora funkcjonującego w osi regulacyjnej nerki-kości-jelito, zachodzi podczas stanu zapalnego, co ma wpływ na pozajelitowe komplikacje, związane z upośledzeniem homeostazy tkanki kostnej.

- Thurston RD, Larmonier CB, **Majewski PM**, Ramalingam R, Midura-Kiela M, Laubitz D, Vandewalle A, Besselsen DG, Muhlbauer M, Jobin C, Kiela PR, Ghishan FK (2010) Downregulation of aging-related Klotho gene in experimental colitis: the role of TNF and IFN-gamma. *Gastroenterology* 138(4):1384-1394

---

Seria publikacji przeglądowych opisująca funkcje MEL u ssaków i ptaków.

**Majewski P**, Markowska M, Pawlak J, Piesiewicz A, Turkowska E, Skwarło-Sońta K (2012) Pineal Gland and Melatonin: Impact on the Seasonality of Immune Defence in Mammals and Birds. *Advances in Neuroimmune Biology* 3:95-108

- Skwarło-Sońta K, **Majewski P** (2010) Melatonin, multifunctional signal molecule in mammals: origin, functions, mechanisms of action. *Folia Medica Lodziensia* 37(1):15-55

- Skwarło-Sońta K, **Majewski P**, Pawlak J, Markowska M. (2007) Photoperiodic vs. non-photoperiodic animals – circadian and seasonal changes in immunity. In: “Melatonin: from molecules to therapy” Eds. SR Pandi-Perumal & D Cardinali, Nova Science Publishers, Inc. New York, pp. 247-260
- 

b) Dorobek naukowy przed obroną doktoratu

Jako doktorant byłem współautorem 4 oryginalnych prac naukowych, ich podsumowanie przedstawione zostało w sposób tematyczny.

---

Seria publikacji opisująca wpływ podania egzogennej MEL na rozwój stanu zapalnego u kurcząt oraz wpływ pobudzenia układu odpornościowego na aktywność szyszynki. Prezentowane wyniki były pierwszymi doniesieniami opisującymi współzależności pomiędzy szyszynką, a układem odpornościowym w modelu zwierzęcym.

- Skwarło-Sońta K, **Majewski P**, Markowska M, Obłap R, Olszańska B. (2003) Bi-directional communication between pineal gland and immune system. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 81(4):342-349
  - Skwarło-Sońta K, **Majewski P**, Markowska M, Jakubowska A, Waloch M. (2002). Bimodal effects of melatonin on the inflammatory reaction in young chickens. In Treatise on pineal gland and melatonin. Edited by. C. Haldar, M. Singaravel and S.K. Maitra. Science Publishers, Inc, Enfield (NH), USA Plymouth, UK: pp. 225-238
  - Skwarło-Sońta K, Adamska I, **Majewski P**, Markowska M. (2002) Pineal gland, melatonin and experimental peritonitis in chickens. In Neuroendocrine System and Pineal Gland with Special Reference to Livestock. Edited and Published by C. Haldar, and S. Singh, Pineal Research Lab, Department of Zoology, Banaras Hindu University, Varanasi – 211 005: pp. 63-73
- 

Publikacja podsumowująca główne tezy mojej pracy magisterskiej dotyczącej wpływu morfiny, egzogennego liganda receptorów opioidowych, na rozwój stanu zapalnego u kury domowej. Główny wniosek z przedstawionych wyników, dotyczy tego, że opiaty odmiennie wpływają na parametry odpornościowe u zwierząt różnych gromad kręgowców, podczas gdy ich wpływ na aktywność leukocytów jest taki sam.

**Majewski P**, Markowska M, Laskowska H, Waloch M, Skwarło-Sońta K. (2002) Effect of morphine on thioglycollate-induced peritonitis in chickens. Neuroendocrinology Letter 23(2):161-167

---

Warszawa, dnia 3 czerwca 2016 r.

