

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Wzrost liczby osób w podeszłym wieku, a co z tym związane wzrost odsetka osób dotkniętych chorobami neurodegeneracyjnymi, jest ogromnym problemem społecznym jak również ekonomicznym. Stąd przeciwdziałanie lub/i spowalnianie procesów neurodegeneracyjnych jest obecnie jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej nauki. Wielu autorów wykazało, iż w tym aspekcie korzystne, plejotropowe działanie posiadają polifenolowe związki syntetyzowane przez niektóre rośliny. Przykładem są pochodne stilbenowe np. naturalnie występujący analog resweratrolu – piceatannol. Związki te, oprócz silnych właściwości antyoksydacyjnych, hamują wydzielanie cytokin oraz regulują szlaki sygnałowe biorące udział w procesie starzenia. Ponadto posiadają silne właściwości anti-amyloidogenne, gdyż przekształcają konformery powstające podczas agregacji peptydu amyloidowego w nietoksyczne produkty.

W patogenezie chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona zasadnicze znaczenie odgrywiają procesy agregacji białek i peptydów, które przyczyniają się do powstania wewnątrzkomórkowych i zewnątrzkomórkowych złogów białkowych. Jednym z głównych komponentów tych złogów są oksydacyjnie zmodyfikowane cząsteczki dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Ostatnie badania przeprowadzone zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* dowiodły, że zagregowane formy GAPDH przyspieszają/inicjują amyloidogenezę peptydów beta amyloidowych (A β) oraz indukują śmierć komórek neuronalnych.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie właściwości biologicznych oraz mechanizmu działania piceatannolu w warunkach stresu oksydacyjnego, w modelowym układzie zawierającym dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego oraz w układzie zawierającym komórki. Badania przeprowadzono z użyciem linii komórkowych powszechnie wykorzystywanych jako model *in vitro* w badaniach schorzeń układu nerwowego, komórek wywodzących się z hipokampalnej linii prawidłowej (mHippoE-18) oraz komórek nerwiaka płodowego (N2a).

Otrzymane wyniki doświadczeń świadczą o tym, iż piceatannol niemal całkowicie hamuje agregację GAPDH wywoływaną działaniem nadtlenu wodoru. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna wykazała, że w tetramerycznej cząsteczce GAPDH występuje 11 potencjalnych miejsc wiązania dla piceatannolu, w tym w centrum aktywnym dehydrogenazy. Przewidywania te potwierdzono doświadczalnie wykorzystując izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne (ITC).

Uzyskane wyniki pozwoliły postawić hipotezę, że wbudowywanie się cząsteczki piceatannolu w centrum katalityczne enzymu i/lub tworzenie kompleksu z Cys149 może mieć korzystne działanie, gdyż może chronić resztę cysteinową przed oksydacyjnymi modyfikacjami, w konsekwencji przed przemieszczaniem się enzymu do jądra komórkowego oraz przed tworzeniem wiązań disulfidowych prowadzących do agregacji i oligomeryzacji GAPDH.

W kolejnym etapie badań udowodniono, że piceatannol znacząco hamuje przemieszczanie GAPDH do jądra w komórkach mHippoE-18 poddanych działaniu stresu oksydacyjnego (H_2O_2). Za pomocą mikroskopii konfokalnej i metody western blot wykazano, iż piceatannol zmniejszał w 90% poziom GAPDH w jądrze. Dalsze analizy, przeprowadzane z wykorzystaniem modelu komórkowego potwierdziły hipotezę wysuniętą na podstawie badań przeprowadzonych *in tube*. Preinkubacja komórek mHippoE-18 z piceatannolem znacznie zmniejszyła proces agregacji i oligomeryzacji GAPDH indukowanej nadmierną, długotrwałą ekspozycją komórek na nadtlenuk wodoru.

Natomiast badania z wykorzystaniem drugiego modelu komórkowego (linii N2a), wykazały, iż ochronne działanie piceatannolu związane jest ze zwiększeniem zarówno aktywności jak i ekspresji peroksydaz glutationowych. Badania Real Time PCR potwierdziły, że badany polifenol stymuluje ekspresję białek niezbędnych w prawidłowym funkcjonowaniu neuronów - sirtuiny 1, seladyny 1 oraz neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF).

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń pozwalają wnioskować, że piceatannol wykazuje wielokierunkowe, neuroprotektcyjne działanie. Uzyskane rezultaty mogą stanowić podstawę dalszych badań, których celem będzie opracowanie nowych strategii prewencji i leczenia chorób neurodegeneracyjnych.



STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM

As the population is aging, the incidence of neurodegeneration diseases is increasing. It is a huge social and economic problem. Hence, the prevention and/or slowing down of neurodegeneration processes are currently one of the most important challenges the modern science is facing. Many authors demonstrated that the polyphenolic compounds, which are synthesized by some plants, have the beneficial, pleiotropic effect in this aspect. One of such examples are stilbene derivatives eg. a naturally occurring analogue of resveratrol – piceatannol. These compounds, in addition to strong antioxidant properties, inhibit cytokine secretion and regulate signaling pathways involved in the aging process. Moreover, they exhibit strong anti-amyloidogenic properties as they convert conformers formed during amyloid peptide aggregation into non-toxic products.

In the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease, protein and peptide aggregation processes play a vital role in contributing to the formation of intracellular and extracellular protein deposits. One of the major component of these deposits is the oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Recent studies, both *in vitro* and *in vivo*, have shown that aggregated GAPDH forms accelerate/initiate amyloidogenesis of amyloid beta peptides (A β) and induce neuronal cell death.

The aim of the presented doctoral thesis was to determine the biological properties and the mechanism of action of piceatannol under oxidative stress conditions in model containing GAPDH, as well as in two cell lines. For these studies, hippocampal cell line (mHippoE-18) and neuroblastoma cell line (N2a), which represent the common *in vitro* models for the study of the molecular mechanisms involved in the manifestation of the neurodegenerative processes were used.

The obtained results have shown that piceatannol almost completely inhibits GAPDH aggregation induced by hydrogen peroxide. Molecular modelling has indicated that in the tetrameric form of GAPDH molecule there are 11 potential binding sites for piceatannol, whereas one is in the active center of the dehydrogenase. These predictions have been experimentally confirmed using isothermal calorimetric titration (ITC). These findings allow us to hypothesize that the incorporation of the piceatannol molecule into the catalytic center of the enzyme and/or complex formation with Cys149 can have positive consequences. It can protect the cysteine residues from oxidative

modifications, which catalyze formation of disulfide bonds, leading to GAPDH aggregation and oligomerization. In this case it can also protect GAPDH from nuclear translocation.

In the next phase of the research, it has been proven that piceatannol prevented GAPDH nuclear translocation in mHippoE-18 cells subjected to oxidative stress (H₂O₂). Confocal microscopy and the western blot analysis indicated that piceatannol reduced the GAPDH level in the nucleus by 90%. Subsequent experiments carried out on the cellular model confirmed the hypothesis formulated on the basis of *in tube* studies. Preincubation of mHippoE-18 cells with piceatannol significantly reduced GAPDH aggregation and oligomerization processes induced by excessive, long-term exposure of cells to hydrogen peroxide.

Nonetheless, studies using another cellular model (N2a line) have shown that protective effect of piceatannol is associated with an increase in both the activity and expression of glutathione peroxidases. Real Time PCR studies confirmed that the tested polyphenol stimulates the expression of the proteins essential for the proper neurons functioning - sirtuin 1, seladin 1 and brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

Findings from the conducted studies allow to conclude that piceatannol has a multi-directional, neuroprotective effect. The obtained results may be the basis for further detailed investigations aimed at developing the new pro-health strategies of treatment and prevention of age-related diseases.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "J. German". The signature is written in a cursive style with a large initial "J" and a long, sweeping underline.