

**Wpływ melatoniny i resweratrolu na zmiany struktury i funkcji
dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego i dehydrogenazy mleczanowej
indukowane reaktywnymi formami tlenu i azotu**

Streszczenie

Stres oksydacyjny i związane z nim oksydacyjne uszkodzenia makrocząsteczek, w tym białek są przyczyną wielu schorzeń związanych z wiekiem. Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) jest wielofunkcyjnym enzymem glikolitycznym, który uczestniczy między innymi w przekazywaniu sygnału redoks w komórce. Oddziaływanie oksydacyjnie zmienionej GAPDH z niektórymi białkami, podobnie jak jej indukowana oksydacyjnymi uszkodzeniami agregacja, mogą stanowić istotny czynnik inicjujący śmierć komórkową. Wymienione cechy dotyczą w dużym stopniu komórek nerwowych i powodują, iż GAPDH już od wielu lat zajmuje istotne miejsce w badaniach nad patomechanizmem chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy Huntingtona. Aktualnie jedną ze strategii dotyczących profilaktyki tych schorzeń jest zapobieganie niepożądanym, oksydacyjnym modyfikacjom i uszkodzeniom białek, w tym także GAPDH.

W prezentowanej pracy doktorskiej porównano wrażliwość GAPDH i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) na działanie wybranych reaktywnych form tlenu i azotu (RFT i RFA). Następnie oceniono skuteczność dwóch naturalnie występujących przeciwutleniaczy: melatoniny i resweratrolu w przeciwdziałaniu indukowanym stresem oksydacyjnym zmianom funkcji i struktury badanych dehydrogenaz. W celu realizacji założeń pracy użyto metod modelowania molekularnego, metod spektroskopii: UV-VIS, dichroizmu kołowego, fluorescencyjnej oraz metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Uzyskane wyniki potwierdziły znacznie większy wpływ RFT i RFA na funkcję i strukturę GAPDH w porównaniu z LDH. Jest to związane z różnicą w budowie obu enzymów, a w szczególności ich centrum aktywnego. W centrum aktywnym GAPDH obecna jest wysoce reaktywna Cys-149, która łatwo ulega odwracalnym i nieodwracalnym modyfikacjom z udziałem tlenku azotu jak i RFT. W przeciwieństwie do GAPDH na aktywność LDH nie mają wpływu modyfikacje reszt cysteiny (utlenianie, S-nitrozylacja), gdyż te nie występują w obszarze centrum aktywnego enzymu. Skutkiem tego jest brak wrażliwości LDH na zmiany funkcjonalne pod wpływem tlenku azotu. Natomiast indukowana działaniem RFT inaktywacja LDH jest poprzedzona większymi w porównaniu z GAPDH zmianami w strukturze czwarto- i drugorzędowej enzymu.

W kolejnym etapie badań ustalono, iż wybrane przeciwutleniacze wykazują zarówno właściwości pro- jak i antyoksydacyjne w badanych układach. Oznacza to, iż mogą nasilać lub redukować indukowane przez reaktywne formy zmiany funkcji i struktury GAPDH i LDH. Chcąc wyjaśnić przyczyny tego zjawiska, dokonano oceny możliwości oddziaływania obu przeciwutleniaczy z cząsteczkami badanych białek. Zgodnie z przewidywaniami dokowania molekularnego GAPDH i LDH mogą związać na swojej powierzchni resweratrol (10 cząsteczek ligandu GAPDH i 27 cząsteczek ligandu LDH) oraz melatoninę (18 cząsteczek ligandu GAPDH i 40 cząsteczek ligandu LDH). W związku z tym za efekt prooksydacyjny w stosunku do białka mogą odpowiadać rodnikowe lub nierodnikowe produkty reakcji resweratrolu i melatoniny z RFT lub RFA. Przypuszczenia te zweryfikowano w układzie zawierającym tlenek azotu, gdzie powstające rodniki fenoksyłowe resweratrolu oraz N-nitrozomelatonina nasilały utlenianie oraz S-nitrozylację Cys-149 GAPDH, a także zmiany konformacyjne w GAPDH i LDH. Podobnie rodniki resweratrolu powstające w obecności anionorodnika ponadtlenkowego nasilały inaktywację GAPDH. Właściwości prooksydacyjne badanych przeciwutleniaczy przeważały w układach, gdzie generowane były mniej reaktywne, ale bardziej selektywne RFT i RFA. Efekt antyoksydacyjny zaobserwowano natomiast kiedy RFT generowane były radiacyjnie. W tym przypadku związane na powierzchni białka cząsteczki przeciwutleniaczy tworzyły tarczę ochronną przed uszkadzającym działaniem wysoce reaktywnego rodnika wodorotlenowego. LDH, która może związać na swojej powierzchni więcej cząsteczek obu przeciwutleniaczy była wydajniej chroniona przed radiacyjnie indukowaną utratą funkcji i zmianami strukturalnymi w porównaniu do GAPDH. Porównując oba przeciwutleniacze to resweratrol był skuteczniejszy w ochronie GAPDH przed radiacyjną inaktywacją oraz lepiej chronił strukturę drugorzędową i tetrameryczną LDH. Jedną z przyczyn tej różnicy jest z pewnością to, iż radiacyjnie generowane rodniki resweratrolu powodują mniejsze uszkodzenia w badanych białkach w porównaniu z rodnikami melatoniny. Ponadto, według dostępnych danych literaturowych, melatonina praktycznie nie zmiata anionorodnika ponadtlenkowego, który jest obok rodnika wodorotlenowego istotnym składnikiem produktów radiolizy wody w warunkach tlenowych. Wiadomo również, iż GAPDH jest znacznie bardziej wrażliwa na działanie tej RFT w porównaniu z LDH.

Podsumowując uzyskane w pracy wyniki zarówno resweratrol jak i melatonina mogą nasilać lub przeciwdziałać oksydacyjnym uszkodzeniom w badanych enzymach glikolitycznych. O tym, który efekt przeważa decyduje rodzaj RFT lub RFA w badanym układzie, a także strukturalna i funkcjonalna wrażliwość danego białka na działanie produktów reakcji RFT i RFA z resweratrolem lub melatoniną.

Joanna Stawicka

**The influence of melatonin and resveratrol on the structural and functional changes of
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase
induced by reactive oxygen and nitrogen species**

Abstract

Oxidative stress and associated with it oxidative damage to macromolecules including proteins are the main causes for age-related diseases. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a multifunctional glycolytic enzyme that is also involved in redox signaling. Interactions of the oxidatively modified GAPDH with specific proteins together with its oxidative damage induced aggregation are both significant factors initiating cell death. These features are especially common to neuronal cells making GAPDH through years an important object of the studies elucidating pathomechanism of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases. One of the prophylaxis strategies against neurodegeneration is to prevent unwanted oxidative modifications and damage to specific proteins including GAPDH.

In the presented thesis it was compared the vulnerability of GAPDH and lactate dehydrogenase (LDH) to selected reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS). Next, it was assessed the efficacy of two naturally occurring antioxidants: melatonin and resveratrol to counteract the oxidative stress induced structural and functional changes of the studied dehydrogenases. In order to fulfil objectives of the study several methods were used, including molecular modeling, UV-VIS spectroscopy, circular dichroism (CD), fluorescence spectroscopy, and high-performance liquid chromatography (HPLC).

The obtained results confirmed greater ROS and RNS impact on the function and structure of GAPDH compared to LDH. It is due to the structural differences of both enzymes, in particular, within their active sites. GAPDH active site contains highly reactive Cys-149 that is easily reversibly and irreversibly modified with both nitric oxide and ROS. Contrary to GAPDH, LDH activity is not affected by the modifications of cysteine residues (oxidation, S-nitrosylation) as they are not present in the active site region of the enzyme. As a result, function of LDH is insensitive to the effect of nitric oxide. However, ROS induced inactivation of LDH was preceded with greater alterations in the quaternary and secondary structure of the enzyme when compared to GAPDH.

In the next stage of the research it was revealed that studied antioxidants exhibit both pro- and antioxidant properties in studied systems. This indicates that they either increase or decrease functional and structural changes of GAPDH and LDH induced by reactive species.

In order to determine the cause of this phenomenon the possibility of interaction between antioxidants and studied proteins was verified. According to molecular docking predictions GAPDH and LDH potentially bind on its surface resveratrol (GAPDH 10 molecules of the ligand and LDH 27 molecules of the ligand) and melatonin (GAPDH 18 molecules of the ligand and LDH 40 molecules of the ligand). Therefore, the prooxidative effect on the protein may be attributable to the action of radical and nonradical products formed in the reaction of melatonin and resveratrol with ROS and RNS. These assumptions were verified in the system containing nitric oxide where formed phenoxyl radical of resveratrol and N-nitroso-melatonin increased oxidation and S-nitrosylation of GAPDH Cys-149 and conformational changes in GAPDH and LDH. Similar effect was observed with resveratrol radicals formed by superoxide anion radical which increased inactivation of GAPDH. Thus, the prooxidative effect of the studied antioxidants was prevalent in the systems containing less reactive but more selective ROS and RNS. In contrast, antioxidative effect was observed when ROS were generated by X-ray radiation. In this case molecules of the antioxidant bound on the surface of protein created a protective shield against damaging effect of hydroxyl radical. LDH which is able to bind on its surface more molecules of both antioxidants was more effectively protected against radiation-induced loss of function and structure damage when compared to GAPDH. By comparing both antioxidants, it was resveratrol which was more effective in protection of GAPDH against inactivation and LDH against changes in the secondary and quaternary structure. One of the reasons for this difference is certainly the fact that radiation generated resveratrol radicals cause less damage to the studied proteins when compared to melatonin radicals. Furthermore, according to the available literature data melatonin is almost inefficient for scavenging superoxide anion radical which is together with hydroxyl radical important product of water radiolysis in the presence of dioxygen. It is also known, that GAPDH is far more sensitive to this type of ROS in comparison to LDH.

Summarizing the results of the thesis it can be concluded that both resveratrol and melatonin are able to enhance or prevent the oxidative damage to investigated glycolytic enzymes. The final outcome is strongly dependent upon the type of ROS and RNS present in the studied system and additionally structural and functional sensitivity of a particular protein to the effect of the reaction products of melatonin and resveratrol with ROS and RNS.

Joanna Skumillo