

Autoreferat

1. Imię i nazwisko: **Aleksandra Małgorzata Rodacka**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Doktor nauk biologicznych **Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, listopad 2004 r.**

Dyscyplina: biofizyka Tytuł rozprawy doktorskiej: „Radiacyjna inaktywacja wybranych dehydrogenaz pod nieobecność i w obecności albuminy lub hemoglobiny”

Promotor: prof. dr hab. Mieczysław Puchała

Magister biologii **Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, czerwiec 1999 r.**

Tytuł rozprawy magisterskiej: „Wpływ idarubicyny (IDA) i aldehydu glutarowego na właściwości erytrocytów człowieka”

Promotor: prof. dr hab. Zofia Józwiak

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Adiunkt (2005 – obecnie) Zakład Radiobiologii, Katedra Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Asystent (2002 – 2005) Zakład Radiobiologii, Katedra Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Doktorantka (1999 – 2004) Uczestnik Studium Doktoranckiego Cytogenetyki, Genetyki Molekularnej i Radiobiologii

4. Wskazanie osiągnięcia 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.):

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Wpływ reaktywnych form tlenu na funkcję i strukturę wybranych dehydrogenaz. Ocena antyoksydacyjnych właściwości tironu i pochodnych stilbenu w badanych procesach”

Powyższe osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie cyklu publikacji. Oświadczenie współautora publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i kopie publikacji habilitanta zawarte są w Załączniku 5 (oświadczenia współautorów) i 6 (katalog z kopiami publikacji).

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Prace oryginalne:

1. **Rodacka A.** 2015. The effect of radiation-induced reactive oxygen species (ROS) on the structural and functional properties of yeast alcohol dehydrogenase (YADH). *International Journal of Radiation Biology*, DOI: 10.3109/09553002.2015.1106022, **IF(2014) – 1,687**; MNiSW – 35.
2. **Rodacka A**, Strumillo J, Serafin E, Puchala M. 2015. Analysis of Potential Binding Sites of 3,5,4'-Trihydroxystilbene (Resveratrol) and trans-3,3',5,5'-Tetrahydroxy-4'-methoxystilbene (THMS) to the GAPDH Molecule Using a Computational Ligand-Docking Method: Structural and Functional Changes in GAPDH Induced by the Examined Polyphenols. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119 (30), 9592–9600. **IF – 3,302**; MNiSW – 30.
3. **Rodacka A**, Strumillo J, Serafin E, Puchala M. 2014. Effect of Resveratrol and Tiron on The Inactivation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Induced by Superoxide Anion Radical. *Current Medicinal Chemistry*, 21 (8), 1061-1069. **IF – 3,853**; MNiSW – 40.
4. **Rodacka A**, Serafin E, Bubiński M, Krokosz A, Puchala M. 2012. The influence of oxygen on radiation-induced structural and functional changes in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase. *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 807–815. **IF – 1,375**; MNiSW – 25.
5. **Rodacka A**, Serafin E, Puchala M. 2010. Efficiency of superoxide anions in the inactivation of selected dehydrogenases. *Radiation Physics and Chemistry*, 79, 960–965. **IF – 1,132**; MNiSW – 25.
6. **Kowalczyk (Rodacka) A¹**, Puchala M, Wesolowska K, Serafin E. 2007. Inactivation of alcohol dehydrogenase (ADH) by ferryl derivatives of human hemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774, 86-92. **IF – 3.078**; MNiSW – 30.

Prace przeglądowe:

7. **Rodacka A**, Gerszon J, Puchala M. 2014. Biologiczne znaczenie oksydacyjnych modyfikacji reszt cysteinowych w białkach na przykładzie dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 68, 280-290. **IF – 0,573**; MNiSW – 15.

¹ W 2008 roku zmieniłam nazwisko z „Kowalczyk” na „Rodacka”

8. **Rodacka A.** 2013. Właściwości i różnorodność funkcjonalna dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67, 775-789. **IF – 0,633**; MNiSW – 15.

łączny współczynnik oddziaływania dla tych prac **IF = 15,633**; MNiSW = 215.

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Do badań przedstawionych w niniejszym osiągnięciu naukowym wybrałam trzy enzymy należące do klasy oksydoreduktaz: dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), dehydrogenazę mleczanową (LDH) oraz dehydrogenazę alkoholową (ADH). Wybrane dehydrogenazy wykazują duże podobieństwo w strukturze m.in. mają zbliżone masy cząsteczkowe, występują w postaci homotetramerów, posiadają niemal identyczną objętość i gęstość molekularną cząsteczki. Powierzchnia cząsteczki GAPDH i LDH jest niemal taka sama, nieco większą powierzchnię posiada ADH (tabela I) (Rodacka i wsp. 2010). Pomimo znacznego podobieństwa, różnią się wrażliwością na działanie czynników utleniających takich jak: produkty radiolizy wody (Kowalczyk i wsp. 2008; Rodacka i wsp. 2010; Rodacka i wsp. 2012), rodniki białkowe (Kowalczyk i wsp. 2008; Morgan i wsp. 2002; Miura i wsp. 1995, 1997).

Tabela I. Porównanie wybranych parametrów struktury badanych dehydrogenaz (na podstawie Protein Data Bank, Rodacka i wsp. 2010, 2012)

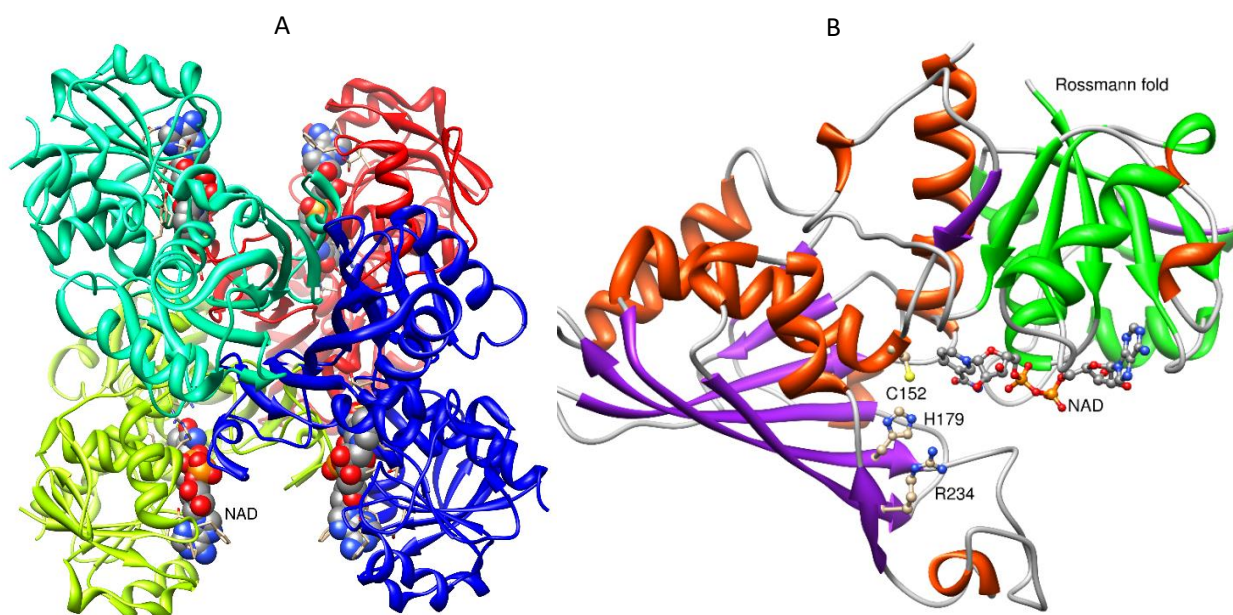
Białko i jego pochodzenie, kod w PDB	Liczba aminokwasów w podjednostce, (masa cząsteczkowa)	Powierzchnia ² cząsteczki (Å ²)	Objętość cząsteczki ³ (Å ³)	Gęstość molekularna	Liczba reszt aminokwasów zawierających siarkę oraz aminokwasów cyklicznych
GAPDH z mięśni królika PDB kod: 1J0X	332 reszty aminokwasowe (142,6 kDa)	39702	103944	1,37	Cys: 4; Trp: 3; Tyr: 9 Phe: 14; Met:9; His:11; Pro:11;
LDH z mięśni królika PDB kod: 3H3F	331 reszty aminokwasowe (145,72 kDa)	39742	107241	1,36	Cys: 5; Trp: 6; Tyr: 7 Phe:7; Met:9; His: 11; Pro: 10;
ADH z drożdży PDB kod: 4W6Z	347 reszty aminokwasowe (147,4 kDa)	43577	106967	1,37	Cys:8; Trp: 5; Tyr: 14; Met: 6; His:13; Pro:13

W komórce nie wszystkie białka są w jednakowym stopniu narażone na działanie stresu oksydacyjnego. Wynika to m.in. z miejsca ich występowania, podatności na działanie czynników oksydacyjnych, dostępności związków redukujących (np. glutationu). **Jednym z najbardziej wrażliwych białek na oksydacyjne i nitrozyłacyjne modyfikacje jest dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego.** GAPDH uważana jest za jedną z głównych tarcz dla czynników utleniających (Hara i wsp. 2006; Hwang i wsp. 2009; Hildebrandt i wsp. 2014). Zaliczana jest do tzw. enzymów metabolizmu podstawowego (ang. housekeeping enzyme) czyli takich, które zaangażowane są w procesy najistotniejsze dla przeżycia komórki i ulegające ekspresji

na stosunkowo stałym, niezmiennym poziomie w większości tkanek organizmu. Zarówno w komórkach eukariotycznych jak i prokariotycznych występuje w bardzo dużych stężeniach, stanowiąc 10-20% całkowitej zawartości białek komórkowych. Najwyższe stężenie GAPDH jest w tych komórkach gdzie zachodzi intensywny proces glikolityczny np. u królika najwięcej GAPDH występuje w komórkach mięśni szkieletowych (ponad 10% wszystkich białek cytoplazmatycznych), dwukrotnie mniej w komórkach mięśni sercowych, czterokrotnie mniej w komórkach wątroby, mózgu i nerkach (Seidler 2013; Rodacka i wsp. 2014).

Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego jest białkiem wielofunkcyjnym, oprócz udziału w szlaku glikolitycznym uczestniczy w wielu niezależnych procesach takich jak: fuzja błon plazmatycznych i jądrowych, tworzenie cytoszkieletu, powstawanie i transport pęcherzyków sekrecyjnych, kontrola ekspresji genów na etapie translacji i transkrypcji, utrzymanie integralności DNA. Ponadto w wyniku S-nitrozylacji reszty cysteinowej występującej w centrum aktywnym, GAPDH w kompleksie z ligazą Siah 1 może przemieszczać się z cytoplazmy do jądra komórkowego i aktywować procesy apoptotyczne (Rodacka 2013; Rodacka i wsp. 2014; Sirover 2011; Sen i wsp. 2008, 2009; Hara i wsp. 2005; Seidler 2013).

W komórkach ssaków dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego występuje głównie w postaci homotetrameru, rzadziej homodimeru i monomeru. Aktywny katalitycznie jest jedynie enzym w postaci tetrameru (rys. 1A).



Rys. 1. Struktura GAPDH człowieka. A) Struktura cząsteczki GAPDH z wbudowanym koenzymem NAD⁺ (każdą z czterech podjednostek zaznaczono innym kolorem). B) Struktura monomeru z wbudowanym koenzymem i z zaznaczonymi aminokwasami występującymi w centrum katalitycznym bezpośrednio zaangażowanymi w reakcję przekształcania aldehydu 3-fosfoglicerynowego do 1,3-bisfosfoglicerynianu: Cys 152 (C152), His 179 (H179) oraz Arg 234 (R234). Dodatkowo, kolorem zielonym zaznaczono pofałdowanie Rossmanna. Grafika wykonana została z wykorzystaniem systemu wizualizacji Chimera VSCF na podstawie krystalograficznej struktury ludzkiej GAPDH; PDB ID 1znq (na podstawie Rodacka 2013).

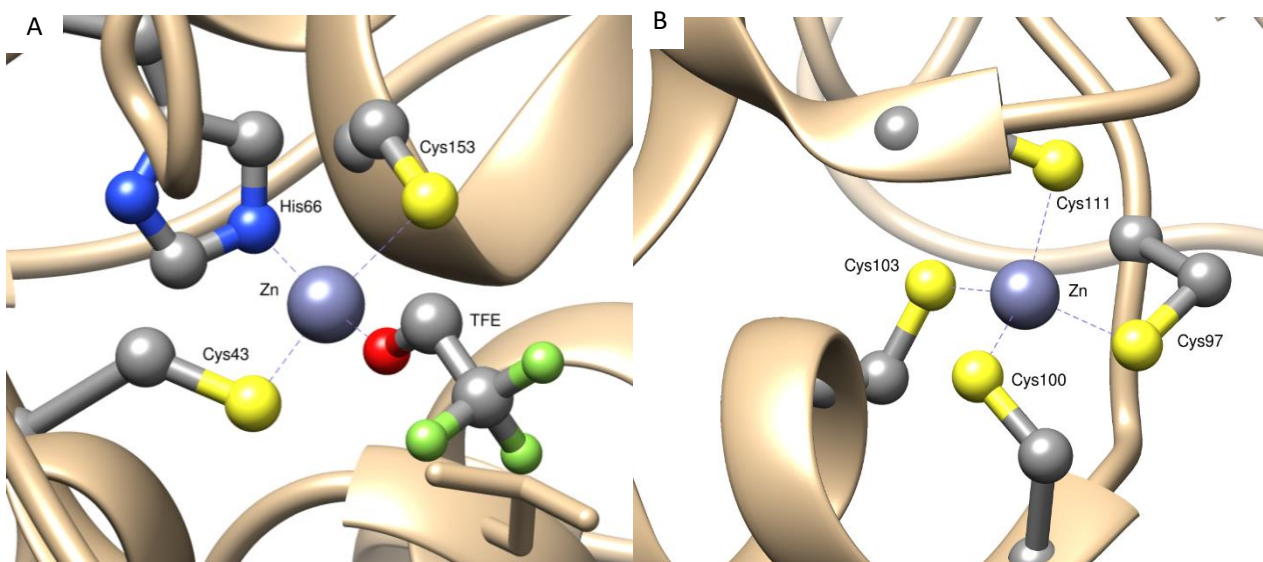
Podjednostka enzymu z mięśni królika złożona jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego zbudowanego z 332 reszt aminokwasowych. W reakcję katalizy bezpośrednio zaangażowane są dwie reszty aminokwasowe: reszta cysteinowa w pozycji 149 (Cys 149) oraz reszta histydyny w pozycji 176 (His 176). Dodatkowo łańcuch boczny reszty argininy w pozycji

231 (Arg 231) ułatwia wiązanie substratu i uwalnianie produktu reakcji. W zależności od pochodzenia enzymu pozycje wyżej wymienionych aminokwasów mogą się różnić np. w GAPDH człowieka jest to Cys 152, His 179 oraz Arg 234 (rys. 1B, Rodacka 2013).

W cząsteczce GAPDH aminokwasem najbardziej wrażliwym na oksydacyjne modyfikacje jest występująca w centrum katalitycznym Cys 149. Oddziałuje ona z dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi takimi jak His 176, Arg 231, Liz 194 oraz 214 co sprawia, że posiada niskie pK_a , około 5,4 (Morgan i wsp. 2002). Oznacza to, że w warunkach fizjologicznych występuje w postaci anionu tiolanowego. Reszty cysteinowe w formie zjonizowanej są znacznie bardziej reaktywne niż formy uprotonowane i łatwo ulegają utlenieniu do kwasów sulfenowych. Mogą także ulegać S-tiolacji, S-nitrozylacji lub tworzyć wewnątrz- lub międzycząsteczkowe mostki disiarczkowe (Rodacka i wsp. 2014). Z analizy struktury krystalograficznej wynika, że reszta Cys 149 występuje blisko powierzchni cząsteczki, w hydrofilowym otoczeniu. Jest dostępna dla rozpuszczalnika co oznacza, że może łatwo wchodzić w reakcje z niskocząsteczkowymi związkami, takimi jak: S-nitrozoglutation, jodoacetamid, DTNB.

Wiele danych literaturowych wskazuje na udział GAPDH w patofizjologii chorób neurodegeneracyjnych. Wykazano m.in. że dehydrogenaza jest jednym z głównych komponentów płytek amyloidowych i splotów neurofibrilarnych oraz ciał Lewy'ego w tkankach mózgu pobranych pośmiertnie od osób ze zdiagnozowaną chorobą Alzheimera i Parkinsona (Wang i wsp. 2005; Cumming i wsp. 2005). Najnowsze badania wykazały, że powstające w następstwie stresu oksydacyjnego agregaty GAPDH przyspieszają amyloidogenezę peptydów amyloidu beta co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki (Itakura i wsp. 2015).

Drugim badanym przeze mnie enzymem była dehydrogenaza alkoholowa pochodząca z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Różni się od GAPDH i LDH tym, iż jest metaloproteiną. W każdej podjednostce występują dwa jony cynku (rys. 2).

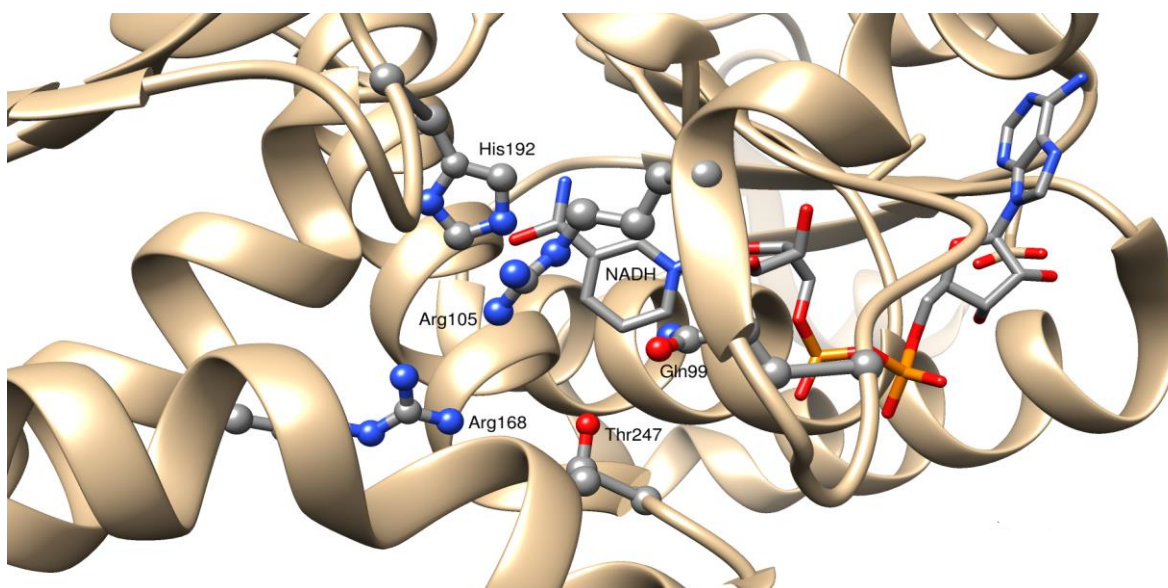


Rys. 2. Lokalizacja jonów cynku w cząsteczce ADH. A – jon cynku zlokalizowany w centrum aktywnym enzymu tworzy kompleks z Cys 43, Cys 153, His 66 oraz z 2,2,2-trifluoroethanol (TFE). TFE stabilizuje kompleks w krystalicznej strukturze ADH. B – jon cynku tzw. „strukturalny”, tworzy kompleks z Cys 97, Cys 100, Cys 103, Cys 111 (na podstawie Rodacka 2015).

Jeden z jonów Zn znajduje się w centrum katalitycznym enzymu. Skompleksowany jest z dwiema resztami cysteinowymi (Cys 43 i 153) i jedną resztą histydynową (His 66) tworząc charakterystyczny dla wielu białek motyw Zn1Cys2His1. Drugi jon cynku w podjednostce ADH tworzy wiązania koordynacyjne z czterema resztami cysteinowymi (Cys 97, 100, 103 and 111), ma zasadnicze znaczenie w utrzymaniu trzecio- i czwartorzędowej struktury białka (Auld i wsp. 2008; Rodacka 2015).

Białka posiadające motyw Zn₁Cys₂His₁ lub Zn₁Cys₂His₂ odgrywają ważną rolę w oddziaływaniach białko-białko oraz białko-DNA. Zaliczamy do nich wiele białek wiążących DNA, w tym wiele czynników transkrypcyjnych, białek regulatorowych, enzymów naprawczych DNA. Aktywność katalityczna oraz integralność centrum aktywnego w ADH zależy od stanu oksydacyjno-redukcyjnego reszt cysteinowych występujących w tym obszarze. W fizjologicznym pH reszty te stosunkowo łatwo ulegają utlenieniu gdyż występują w formie zjonizowanej (ich wartość pK_a zwykle jest poniżej 7). Utlenienie reszt cysteinowych w centrum katalitycznym ADH prowadzi do utraty funkcji katalitycznych oraz nieodwracalnego uwolnienia jonów cynku (Auld i Bergman 2008; Men i Wang 2007; Cook i wsp. 2012).

Trzecim badanym enzymem była dehydrogenaza mleczanowa pochodząca z mięśni królika. Enzym ten występuje we wszystkich komórkach oraz płynach ustrojowych ssaków. Jego cząsteczki są tetramerami złożonymi z różnych kombinacji dwóch podjednostek: podjednostki H tzw. sercowej i podjednostki M tzw. mięśniowej. Obie podjednostki są podobne pod względem struktury, a ich sekwencja aminokwasowa pokrywa się w 75%. Różnią się właściwościami katalitycznymi. Podjednostka M preferencyjnie bierze udział w reakcji przemiany pirogronianu do mleczanu, natomiast podjednostka H uczestniczy w reakcji odwrotnej. W mięśniach i w wątrobie występuje izoenzym złożony z czterech identycznych podjednostek typu M. Podjednostka LDH pochodząca z mięśni królika złożona jest z 331 reszt aminokwasowych.



Rys. 3. Struktura centrum aktywnego LDH z wbudowanym koenzymem i z zaznaczonymi aminokwasami występującymi w centrum katalitycznym (grafika wykonana została z wykorzystaniem systemu wizualizacji Chimera VSCF na podstawie krystalograficznej struktury LDH królika; PDB ID 3H3F).

W reakcję katalizy bezpośrednio zaangażowana jest reszta histydyny w pozycji 192 (His 192), która jest donorem protonu w reakcji przekształcania pirogronianu do mleczanu i razem z resztą argininy w pozycji 105 (Arg 105) ma zasadnicze znaczenie w wiązaniu substratu. Dodatkowo reszta kwasu asparaginowego w pozycji 165 (Asp 165) oraz reszta argininy w pozycji 168 (Arg 168) utrzymują kompleks enzym-substrat (rys. 3, Dempster i wsp. 2014).

Duża zawartość białek w komórce oraz wysoka reaktywność z większością czynników utleniających skutkuje tym, iż w warunkach stresu oksydacyjnego, ale także w warunkach fizjologicznych to właśnie białka w największym stopniu ulegają uszkodzeniom (Du i Gebicki 2004; Gebicki 2006; Davies 2005). Oksydacyjne uszkodzone białka mogą być zarówno przyczyną, jak konsekwencją rozwoju wielu chorób m.in. choroby Alzheimera, choroby Parkinsona, cukrzyca, miażdżyca, zaćmy (Beal i wsp. 2002; Stadtman 2001; Butterfield i wsp. 2011). Ponadto odkładanie się oksydacyjnie zmodyfikowanych białek jest ściśle związane z procesami starzenia (Stadtman 2001, 2004; Grimm i wsp. 2011).

Celem pracy było określenie, które cechy strukturalne badanych białek warunkują ich wrażliwość na uszkodzenia i utratę aktywności pod wpływem reaktywnych form tlenu. Ponadto celem pracy było określenie wpływu niskocząsteczkowych związków o potencjalnych właściwościach antyoksydacyjnych na właściwości funkcjonalne i wybrane parametry struktury dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego.

Uzyskane rezultaty mogą być pomocne w przewidywaniu podatności na wolnorodnikową inaktywację innych enzymów bez konieczności szczegółowych badań oraz mogą pozwolić na takie modyfikacje strukturalne białek metodami inżynierii genetycznej i chemicznej, aby charakteryzowały się mniejszą podatnością na wolnorodnikową denaturację. Wskazanie niskocząsteczkowych związków efektywnie chroniących białka przed uszkodzeniami może mieć duże znaczenie w prewencji i leczeniu wielu chorób, w powstawaniu i przebiegu których istotną rolę odgrywają oksydacyjne modyfikacje białek, w tym chorób neurodegeneracyjnych.

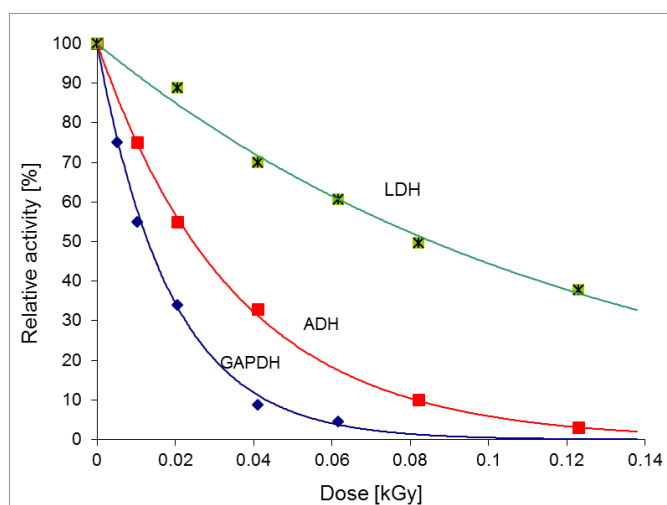
Reaktywne formy tlenu (RFT) generowałam radiacyjnie przy użyciu aparatu rentgenowskiego lub chemicznie w reakcji ksantyny z oksydazą ksantynową. Pomiarów wykonywałam metodami spektroskopii absorpcyjnej, fluorescencji, spektroskopii dichroizmu kołowego (CD) oraz elektroforetycznego rozpraszania światła (potencjał zeta). Przeprowadziłam rozdziały elektroforetyczne (SDS-PAGE). Dodatkowo badania eksperymentalne we współpracy z dr Eligiuszem Serafinem uzupełniono o analizę bioinformatyczną (computational molecular-docking study).

Badania prowadzone w ramach osiągnięcia naukowego obejmowały następujące tematy:

1. Ustalenie mechanizmu radiacyjnej inaktywacji badanych dehydrogenaz oraz określenie efektywności produktów radiolizy wody ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2) w tym procesie

Inspiracją do podjęcia badań wyżej opisanych dehydrogenaz było różna ich promienioczułość, pomimo znacznego podobieństwa budowy. Najbardziej podatna na radiacyjną inaktywację była dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (rys. 4). Radiacyjna wydajność procesu inaktywacji wynosiła $G_{\text{inak}} = 0,0178 \mu\text{mol J}^{-1}$. Mniej podatna była

dehydrogenaza alkoholowa ($G_{\text{inak.}} = 0,0119 \mu\text{mol J}^{-1}$). Najmniejszą podatność na działanie produktów radiolizy wody wykazywała dehydrogenaza mleczanowa ($G_{\text{inak.}} = 0,0029 \mu\text{mol J}^{-1}$) (tabela III) (Rodacka i wsp. 2010).



Rys. 4. Zależność względnej aktywności GAPDH, ADH i LDH od dawki promieniowania jonizującego (zmodyfikowano na podstawie Rodacka i wsp. 2010).

W wyniku radiolizy wody generowane są reaktywne formy tlenu, takie które powstają także w żywych organizmach na skutek procesów biochemicznych, zwłaszcza tych związanych z oddychaniem. W celu określenia efektywności produktów radiolizy wody w inaktywacji badanych enzymów pomiary aktywności wykonywałam w czterech układach eliminując kolejno poszczególne produkty. Podczas napromieniowania roztworów w atmosferze powietrza (układ I) głównymi produktami radiolizy wody w pH 7 są: $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 . W tym układzie na aktywność enzymu wpływ miały wszystkie ww. reaktywne formy tlenu. W celu usunięcia rodników hydroksylowych do układu II dodałam alkohol (mannitol). W reakcji mannitolu z $\cdot\text{OH}$ powstały stosunkowo mało reaktywne rodniki mannitolowe. Anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru usunęłam w kolejnych układach dodając, oprócz mannitolu, dysmutazę ponadtlenkową (SOD) oraz katalazę (układ III i IV). Przed produktami w poszczególnych układach podałam radiacyjno-chemiczną wydajność w $\mu\text{mol J}^{-1}$.

Układ I	Enzym	→	0,28 $\cdot\text{OH}$ + 0,34 $\text{O}_2^{\cdot-}$ + 0,07 H_2O_2
Układ II	Enzym + Mannitol	→	0,34 $\text{O}_2^{\cdot-}$ + 0,07 H_2O_2 + 0,28 $\text{Man}(\text{O}_2)\cdot$
Układ III	Enzym + Mannitol + SOD	→	0,24 H_2O_2 + 0,28 $\text{Man}(\text{O}_2)\cdot$
Układ IV	Enzym + Mannitol + SOD + Katalaza	→	0,28 $\text{Man}(\text{O}_2)\cdot$

Na podstawie radiacyjnych wydajności poszczególnych produktów oraz poziomu inaktywacji enzymów w danym układzie eksperymentalnym obliczyłam efektywność reaktywnych form tlenu oraz rodnika mannitolowego w inaktywacji badanych dehydrogenaz (tabela II).

Tabela II. Efektywność reaktywnych form tlenu generowanych radiacyjnie oraz rodnika mannitolowego w inaktywacji badanych dehydrogenaz (na podstawie publikacji Rodacka i wsp. 2010).

Czynnik utleniający	GAPDH	ADH	LDH
$\cdot\text{OH}$	0,0402	0,0350	0,0096
$\text{O}_2^{\cdot-}$	0,0166	0,0059	0,0005
H_2O_2	0,0132	0,0017	0,0003
$\text{Man}(\text{O}_2)\cdot$	0,0058	0,0011	0,0001

Efektywność (f) obliczono ze wzoru: $G_{\text{inact}} = \sum f_i \times G_i$ gdzie f_i oznacza efektywność w inaktywacji i -tego produktu, G_i jest to wydajność radiacyjno-chemiczna i -tego produktu, np. dla I układu:

$$G_{\text{inact}} = f_{\text{OH}} \times G_{\text{OH}} + f_{\text{O}_2^{\cdot-}} \times G_{\text{O}_2^{\cdot-}} + f_{\text{H}_2\text{O}_2} \times G_{\text{H}_2\text{O}_2} = f_{\text{OH}} \times 0,28 + f_{\text{O}_2^{\cdot-}} \times 0,34 + f_{\text{H}_2\text{O}_2} \times 0,07$$

Wiadomo, iż rodnik hydroksylowy jest najskuteczniejszy w radiacyjnych uszkodzeniach związków organicznych. Jego oddziaływanie z białkami i peptydami charakteryzuje się bardzo wysokimi stałymi szybkości reakcji rzędu 10^9 - $10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Buxton i wsp. 1988). Rodnik $\cdot\text{OH}$ najskuteczniej inaktywował badane dehydrogenazy, jednak jego efektywność w inaktywacji badanych enzymów znacznie się różniła. Największą efektywność wykazywał w stosunku do GAPDH (0,0402), następnie ADH (0,0350). W najmniejszym stopniu wpływał na aktywność LDH (0,0096). Wykazałam także znaczną efektywność anionorodnika ponadtlenkowego w inaktywacji przede wszystkim GAPDH, ale także ADH. Anionorodnik nie wpływa natomiast znacząco na aktywność LDH. W pracach wielu autorów pomijano bezpośredni wpływ anionorodnika ponadtlenkowego na uszkodzenia struktury i zmiany w funkcjonowaniu białek. Podobnie jak nadtlenek wodoru, $\text{O}_2^{\cdot-}$ postrzegany był głównie jako prekursor bardziej reaktywnych gatunków rodnikowych takich jak $\cdot\text{OH}$, ONOO^- (Gebicki 2006; Bielski i Cabelli 1995; Schüssler i Puchala 2004). Oszacowałam, że efektywność $\text{O}_2^{\cdot-}$ w inaktywacji GAPDH była jedynie 2,4 razy mniejsza od efektywności rodnika hydroksylowego. Skuteczność anionorodnika ponadtlenkowego w inaktywacji GAPDH i ADH potwierdziłam w innych układach eksperymentalnych, w których $\text{O}_2^{\cdot-}$ generowałam chemicznie w reakcji ksantyny z oksydazą ksantynową. Podobnie jak we wcześniej opisanych badaniach $\text{O}_2^{\cdot-}$ inaktywował GAPDH i ADH, nie wpływał natomiast znacząco na aktywność LDH (Rodacka i wsp. 2010, 2014, 2015). Spośród badanych dehydrogenaz nadtlenek wodoru i rodniki mannitolowe efektywnie inaktywowały GAPDH, w niewielkim stopniu ADH i praktycznie nie powodowały inaktywacji LDH (tabela II).

Znaczna efektywność anionorodnika ponadtlenkowego w inaktywacji GAPDH i ADH związana jest z występowaniem w centrum katalicznym obu enzymów reszt cysteinowych. Wykazano, że spośród aminokwasów najbardziej podatnych na utlenianie przez $\text{O}_2^{\cdot-}$ są grupy tiolowe (m.in. Winterbourn i Hampton 2008; Houée-Levin i Bobrowski 2013). Anionorodnik ponadtlenkowy charakteryzuje się stosunkowo długim okresem półtrwania i stosunkowo niską reaktywnością z większością reszt aminokwasowych. Nawet jeśli powstanie w miejscu oddalonym od centrum aktywnego enzymu to może do niego przedyfundować. W konsekwencji może spowodować znaczną inaktywację enzymów.

Przeprowadziłam badania, które pozwoliły mi ustalić mechanizm radiacyjnej inaktywacji badanych enzymów oraz wskazać cechy struktury w największym stopniu odpowiadające za różną ich promienioczułość. Dwie spośród badanych dehydrogenaz tj. GAPDH i ADH są

enzymami tiolo-zależnymi tzn. ich aktywność zależy od stopnia utlenienia reszt cysteinowych w centrum aktywnym. W dehydrogenazie mleczanowej w obszarze centrum katalitycznego nie występują reszty cysteinowe, a w reakcję katalizy bezpośrednio zaangażowana jest głównie reszta histydyny w pozycji 192. W związku z tym sprawdziłam jak zmienia się zawartość wolnych grup SH reszt cysteinowych i jaki ma to wpływ na aktywność enzymatyczną badanych dehydrogenazach poddanych działaniu reaktywnych form tlenu generowanych radiacyjnie (Rodacka i wsp. 2012; Rodacka 2015). Najwyższą inaktywację i utlenianie reszt cysteinowych obserwowałam w GAPDH napromieniowanej w atmosferze powietrza. Proces ten przebiega dwuetapowo. Przy najniższej zastosowanej dawce (0,11 kGy) obserwowałam gwałtowny spadek zawartości grup SH oraz znaczną inaktywację enzymu. Przy utlenieniu ok. 25% reszt cysteinowych (tj. ok. 4 reszty) aktywność enzymu spadła do ok. 40% w stosunku do aktywności enzymu nie poddanego napromieniowaniu (kontrola). Nieco mniejszy efekt obserwowałam po napromieniowaniu GAPDH w atmosferze podtlenu azotu, pomimo iż w tych warunkach generowane było dwukrotnie więcej rodników hydroksylowych niż podczas napromieniowania roztworów w atmosferze powietrza. Na podstawie analizy usytuowania reszt cysteinowych w GAPDH przeprowadzoną z wykorzystaniem programów i narzędzi bioinformatycznych (program Swiss-PBD Viewer DeepView) stwierdziłam, że w pierwszej kolejności utlenieniu ulegają grupy SH reszt cysteinowych usytuowanych blisko powierzchni cząsteczki, w hydrofilowym otoczeniu. W cząsteczce GAPDH jest to reszta w pozycji 281 oraz reszta usytuowana w centrum aktywnym (Cys 149). W LDH poddanej działaniu produktów radiolizy wody obserwowałam znacznie mniejsze zmiany struktury i funkcji niż w GAPDH. Enzym napromieniowany w atmosferze powietrza dawką 0,11 kGy zachował aktywność w ok. 75%, nie obserwowałam znaczącego utleniania reszt cysteinowych. Większe zmiany odnotowałam po napromieniowaniu LDH w atmosferze podtlenu azotu. Przy dawce 0,11 kGy aktywność enzymu obniżyła się do ok. 60%, utlenieniu uległo ok. 5% reszt cysteinowych w cząsteczce (ok. 1 reszta). Analiza struktury przeprowadzona za pomocą programów bioinformatycznych wykazała, że reszty tiolowe w cząsteczce LDH usytuowane są w głębszych, hydrofobowych obszarach cząsteczki. Ich utlenienie zachodzi dopiero wtedy gdy dojdzie do częściowego rozfałdowania cząsteczki enzymu. Dzięki oznaczeniom przeprowadzonym w preparatach napromieniowanych w atmosferze powietrza oraz w atmosferze podtlenu azotu mogłam ocenić wpływ tlenu cząsteczkowego na stopień radiacyjnych uszkodzeń GAPDH i LDH. W przypadku dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego większa inaktywacja oraz utlenianie grup SH zachodziła w atmosferze powietrza niż w podtlenu azotu. Przeciwną tendencję obserwowałam dla LDH. Wynika z tego, że GAPDH jest bardziej podatna na uszkodzenia wywołane działaniem anionorodnika ponadtlennego i powstających nadtlenków/wodoronadtlenków białkowych niż LDH. Potwierdzają to moje wcześniejsze badania, na podstawie których oszacowałam, że $O_2^{\cdot-}$ jest jedynie 2,4 razy mniej efektywny w inaktywacji GAPDH niż rodnik $\cdot OH$. Efektywność anionorodnika w inaktywacji LDH jest minimalna (Rodacka i wsp., 2010). Potwierdza to rezultaty uzyskane w pracy innych autorów, którzy wykazali, że wodoronadtlenki peptydów i białek inaktywują GAPDH, natomiast nie wpływają na aktywność LDH (Morgan i wsp. 2002).

Tabela III. Wydajności radiacyjnej inaktywacji, utleniania reszt cysteinowych, destrukcji reszt tryptofanowych oraz tworzenia wodoronadtlenków w GAPDH, LDH i ADH (na podstawie prac: Rodacka wsp. 2010, 2012 oraz Rodacka 2015).

Enzymy	G [$\mu\text{mol J}^{-1}$]			
	Aktywność	Grupy -SH	Tryptofan	Wodoronadtlenki
GAPDH	0,0178 ^a	0,363 (I frakcja) ^b 0,024 (II frakcja) ^b	0,037 ^b	0,050 ^b
ADH	0,0119 ^a	0,167 ^c	0,055 ^c	0,040 ^c
LDH	0,0029 ^a	0,004 ^b	0,045 ^b	0,036 ^b

^a Dane z pracy Rodacka i wsp. 2010.

^b Dane z pracy Rodacka i wsp. 2012. Wydajność radiacyjnego utleniania reszt cysteinowych i destrukcji reszt tryptofanowych w GAPDH i LDH obliczyłam na podstawie wartości k ($k=1/D_{37}$) zamieszczonych w publikacji.

^c Dane z pracy Rodacka 2015.

W ADH poddanej napromienianiu w atmosferze powietrza wraz ze wzrostem inaktywacji enzymu obserwowałam stopniowe utlenienie grup SH oraz uwalnianie jonów cynku. Utracie aktywności ADH w ok. 25% towarzyszyło utlenienie 1 reszty cysteinowej oraz uwolnienie jednego jonu cynku w przeliczeniu na monomer białka. Świadczy, to o tym iż pod wpływem produktów radiolizy wody w pierwszej kolejności utlenieniu ulegają reszty cysteinowe, zarówno w centrum katalitycznym jak i w innych obszarach cząsteczki, które skompleksowane są z atomami cynku. Ma to duże znaczenie dla konformacji białka gdyż cynk stabilizuje obszar centrum katalitycznego oraz III i IV-rzędową strukturę cząsteczki. Prace innych autorów wykazały, że niektóre czynniki utleniające (np. H_2O_2 , HOSEN) działają bardziej selektywnie i utleniają grupy SH reszt cysteinowych występujących w motywie ZnCys_2His czyli w obszarze centrum katalitycznego (Men i Wang 2007; Cook i wsp. 2012).

Zmiany konformacyjne badanych dehydrogenaz poddanych działaniu reaktywnych form tlenu badałam na podstawie destrukcji i zmian otoczenia reszt tryptofanowych (Rodacka i wsp. 2012; Rodacka 2015). Reszty te najczęściej występują w hydrofobowym wnętrzu białka, rzadziej umiejscowione są blisko lub na powierzchni cząsteczki. Uszkodzenie ich prowadzi do znacznych zmian struktury białka. Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego posiada trzy reszty tryptofanowe w monomerze. Dwie usytuowane są wewnątrz białka (hydrofobowe otoczenie) natomiast reszta Trp 193 występuje w powierzchniowych obszarach enzymu (hydrofilowe otoczenie). W monomerze LDH jest dwukrotnie więcej reszt tryptofanowych niż w GAPDH, cztery reszty położone są wewnątrz cząsteczki, natomiast dwie w zewnętrznych jej obszarach (Trp 147 i 323). W ADH występuje 5 reszt Trp, z których cztery wewnątrz cząsteczki, natomiast jedna reszta (Trp 50) praktycznie na powierzchni cząsteczki. Skutkiem dwukrotnie większej liczby reszt Trp eksponowanych na powierzchni cząsteczki LDH (w hydrofilowym otoczeniu) jest przesunięcie maksimum emisji fluorescencji o 10 nm w stronę fal dłuższych w porównaniu z GAPDH i ADH (Rodacka i wsp. 2012; Rodacka 2015). Pod wpływem produktów radiolizy wody generowanych w atmosferze powietrza destrukcja reszt tryptofanowych zachodzi w niewielkim stopniu w badanych enzymach. Największą wydajność procesu destrukcji Trp wyznaczyłam dla ADH ($0,055 \mu\text{mol J}^{-1}$), następnie dla LDH ($0,045 \mu\text{mol J}^{-1}$) i GAPDH ($0,037 \mu\text{mol J}^{-1}$) (Rodacka 2015; Rodacka i wsp. 2012). Dla porównania, dla dawki 0,2 kGy destrukcji ulega średnio ok.

1 reszta tryptofanu w monomerze ADH i GAPDH oraz ok. 1,3 reszty tryptofanu w monomerze LDH. Na podstawie moich badań oraz dokładnych analiz struktury przeprowadzonych z wykorzystaniem programów bioinformatycznych mogę stwierdzić, że destrukcji ulegają głównie te reszty, które występują blisko powierzchni cząsteczki. Uzyskane rezultaty świadczą o tym, że ich destrukcja nie wpływa znacząco na różną promienioczułość badanych dehydrogenaz.

Dla ogólnej oceny zmian konformacyjnych dehydrogenaz poddanych działaniu promieniowania jonizującego w obecności tlenu zastosowałam metodę gaszenia fluorescencji tryptofanowej przy użyciu akrylamidu (Rodacka 2015). Akrylamid jest obojętnym związkiem, który może wnikać do wnętrza cząsteczki białka na drodze dyfuzji. W związku z tym może gasić fluorescencję tryptofanów zarówno tych występujących blisko powierzchni jak i tych w głębszych, hydrofobowych obszarach cząsteczki. Wartości stałej Sterna-Volmera (K_{SV}) świadczą o różnej dostępności reszt tryptofanowych dla wygaszacza. Pod wpływem promieniowania jonizującego w największym stopniu zmieniła się konformacja GAPDH. Przy dawce 235 Gy stała K_{SV} wzrosła dwukrotnie w porównaniu do kontroli, co świadczy o rozfałdowaniu cząsteczki i zwiększonej efektywności gaszenia fluorescencji przez akrylamid. Znacznie mniejsze zmiany konformacji zachodziły w LDH, stała gaszenia K_{SV} przy dawce 235 Gy wzrosła ok. 1,4 razy w stosunku do kontroli (dane prezentowane na konferencji: Rodacka i wsp. XIV Conference of Polish Biophysics Society, 2010). Odwrotny charakter zmian obserwowałam dla ADH, wartość K_{SV} spadała wraz z dawką promieniowania. W tym przypadku struktura cząsteczki zmieniła się w taki sposób, że dostępność akrylamidu do reszt Trp zmniejszyła się (Rodacka 2015). Przy dawce 235 Gy z każdej podjednostki ADH uwolniło się ok. 1,8 jonów cynku. Jak wcześniej nadmieniłam, jony cynku stabilizują III i IV rzędową strukturę cząsteczki. Na podstawie wyników uzyskanych z gaszenia fluorescencji mogę wnioskować, że uwolnienie jonów cynku spowodowało powstanie nowych wiązań sieciujących wewnątrz cząsteczki, rezultatem czego jest zmniejszona dostępność akrylamidu do reszt tryptofanowych.

Wodoronadtlenki białek są głównym produktem reakcji wolnych rodników z białkami w obecności tlenu (Gebicki i Gebicki, 1993; Peskin i wsp. 2010; Rahmanto i wsp. 2010). Ustaliłam, że pod wpływem produktów radiolizy wody najwyższa wydajność tworzenia wodoronadtlenków jest w cząsteczce GAPDH ($0,050 \mu\text{mol J}^{-1}$), natomiast najniższa w cząsteczce LDH ($0,036 \mu\text{mol J}^{-1}$) (tabela III). W pracach prof. Gebickiego (Gebicki i Gebicki, 1993) wykazano, że pod wpływem promieniowania gamma grupy wodoronadtlenkowe preferencyjnie powstają na resztach waliny, proliny, leucyny, izoleucyny oraz lizyny. Na podstawie analizy przy użyciu programu Swiss-PBD Viewer DeepView wykazałam, że na powierzchni GAPDH jest o 12 więcej takich reszt niż w cząsteczce LDH (Rodacka i wsp. 2012).

Przeanalizowałam zmiany zawartości struktur drugorzędowych badanych dehydrogenaz poddanych działaniu promieniowania jonizującego w obecności tlenu. W najmniejszym stopniu zmieniała się struktura drugorzędowa ADH. Zawartość alfa helisy dla białka nienapromieniowanego (kontrola) wynosiła 20%. Po napromieniowaniu dawką 235 Gy spadła do ok 14%. Równoległe wzrosła zawartość struktur beta, z 43% do 49% (Rodacka 2015). W LDH poddanej działaniu produktów radiolizy wody zawartość struktury alfa spadła z ok. 42% (kontrola) do 22%. Nastąpił wzrost struktur beta od ok. 31% do ok. 43%. Największe zmiany w strukturze drugorzędowej nastąpiły w GAPDH poddanej działaniu promieniowania jonizującego. Obserwowałam znaczny spadek zawartości alfa helisy, od wartości 38% (kontrola)

do 17%. W przypadku tego białka w największym stopniu nastąpił przyrost struktur beta, od 26% dla białka nienapromieniowanego do 62% dla białka napromieniowanego dawką 235 Gy (dane własne, niepublikowane). Duża zawartość struktur beta w białkach sprzyja tworzeniu oligomerów i agregatów białkowych (Meredith, 2005; Li i wsp. 2014). Wykazałam, że w preparatach GAPDH napromieniowanych zarówno w atmosferze powietrza jak i w podtlenu azotu degradacja cząsteczki zachodzi głównie na skutek tworzenia wysokocząsteczkowych produktów. Agregaty GAPDH w znacznym stopniu zanikały w obecności czynników redukujących (DTT) (Rodacka i wsp. 2012). Wnioskuje zatem, że agregacja GAPDH odbywa się głównie w wyniku tworzenia wiązań disiarczkowych. Wyniki prac innych autorów wskazują, że w tworzeniu mostków disiarczkowych, odpowiedzialnych za oligomeryzację i agregację GAPDH, w największym stopniu uczestniczą dwie reszty cysteinowe: Cys 149 ulokowana w centrum aktywnym oraz Cys 281 znajdująca się blisko powierzchni białka (Nakajima i wsp. 2007, 2009).

LDH poddana działaniu promieniowania jonizującego zarówno w atmosferze powietrza jak i w podtlenu azotu w większym stopniu ulegała fragmentacji niż agregacji. Wysokocząsteczkowych produktów powstających po napromieniowaniu LDH było około połowę mniej niż w preparatach GAPDH. W niewielkim stopniu ulegały one redukcji pod wpływem DTT. Oznacza to, że agregaty LDH powstają na skutek tworzenia wiązań sieciujących innych niż mostki disiarczkowe np. na skutek wiązań dityrozynowych (Rodacka i wsp. 2012). Elektroforeza preparatów ADH napromieniowanych w atmosferze powietrza wykazała, iż degradacja cząsteczek zachodzi głównie na skutek fragmentacji, powstające w niewielkim stopniu wysokocząsteczkowe produkty zanikały w obecności czynnika redukującego (Rodacka 2015).

Modyfikacje reszt tyrozynowych w badanych białkach analizowałam na podstawie absorpcyjnych widm różnicowych wykreślonych w zakresie UV (Rodacka 2015 oraz dane prezentowane na konferencji: Strumiłło i wsp. BioOpen 2015). Na podstawie uzyskanych obserwacji mogę wnioskować, że pod wpływem reaktywnych form tlenu generowanych radiacyjnie w atmosferze powietrza dominującym produktem utleniania reszt tyrozynowych w badanych dehydrogenazach jest L-DOPA. Oprócz L-DOPA w napromienionych roztworach w znacznie mniejszym stopniu powstają inne produkty utleniania, np. dityrozyny. Wstępne badania wykazały, że spośród badanych enzymów najbardziej podatna na tworzenie wiązań dityrozynowych jest LDH, w mniejszym stopniu GAPDH, natomiast najmniej takich modyfikacji zachodzi w ADH. Podobne obserwacje uzyskali inni autorzy, którzy wykazali, że w białkach w obecności $\cdot\text{OH}$ i $\text{O}_2^{\cdot-}$ głównym produktem modyfikacji reszt tyrozynowych jest L-DOPA, a wiązania dityrozynowe powstają w niewielkim stopniu (Mozziconacci i wsp. 2007; Houe'e-Levin wsp. 2015).

Na podstawie przeprowadzonych badań mogę stwierdzić, że:

1. Najbardziej podatna na radiacyjną inaktywację i modyfikacje struktury jest dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, w najmniejszym stopniu modyfikacji ulega dehydrogenaza mleczanowa.
2. Największą efektywność w inaktywacji GAPDH i ADH wykazuje rodnik $\cdot\text{OH}$, następnie $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 . LDH efektywnie inaktywowana jest tylko przez rodnik $\cdot\text{OH}$.

3. Rodniki mannitolowe w największym stopniu inaktywują GAPDH, nie powodują inaktywacji LDH.
4. Modyfikacje reszt cysteinowych w największym stopniu wpływają na funkcję i strukturę GAPDH i ADH. Skutkiem oksydacyjnych modyfikacji reszt cysteinowych w GAPDH jest utrata właściwości funkcjonalnych i zwiększona agregacja białka. W przypadku ADH wraz z ubytkiem wolnych grup SH i inaktywacją enzymu dochodzi do uwolnienia jonów cynku. Tak więc różna promienioczułość badanych enzymów w największym stopniu związana jest usytuowaniem grup SH w białku (przede wszystkim tych występujących w centrum aktywnym enzymu).
5. Na różną promienioczułość badanych enzymów w mniejszym stopniu wpływa także liczba reszt aminokwasowych na powierzchni cząsteczki najbardziej podatnych na tworzenie wodoronadtlenków.
6. Destrukcja reszt tryptofanowych nie wpływa na różną promienioczułość badanych dehydrogenaz.
7. Zwiększona agregacja GAPDH pod wpływem promieniowania jonizującego koreluje ze wzrostem zawartości struktur beta.

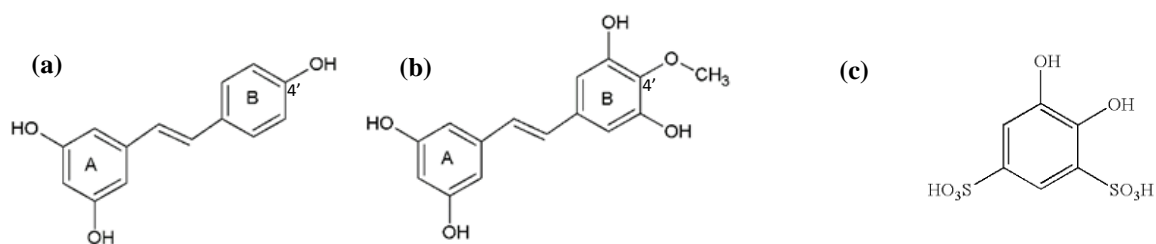
2. Oddziaływanie związków wykazujących silne właściwości antyoksydacyjne z dehydrogenazą aldehydu 3-fosfoglicerynowego

Wiele badań wskazuje na udział dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych związanych z wiekiem np. w chorobie Alzheimera, Parkinsona (Itakura i wsp. 2015; Butterfield i wsp. 2010; Huang i wsp. 2009, 2011; Chuang i wsp. 2005; Rodacka i wsp. 2014). Akumulacja GAPDH w wewnątrzkomórkowych agregatach białkowych jest wynikiem denaturacji enzymu w następstwie stresu oksydacyjnego (Naletova i wsp. 2008; Butterfield i wsp. 2010). Celem wielu obecnie prowadzonych badań jest poszukiwanie związków o silnych antyoksydacyjnych właściwościach, które przeciwdziałałyby lub/i spowalniały procesy prowadzące do agregacji białek. Duże zainteresowanie wzbudzają substancje pochodzenia naturalnego, ich aktywność biologiczną poparto wieloma badaniami (Strumiłło i wsp. 2015; Gerszon i wsp. 2014; Jimenez-Aliaga i wsp. 2011; Bhullar i Rupasinghe 2013).

Kolejnym zagadnieniem którym zajęłam się więc w pracy była ocena w jaki sposób niskocząsteczkowe związki o potencjalnie silnych właściwościach antyoksydacyjnych działają na strukturę i funkcję GAPDH poddaną działaniu anionorodnika ponadtlenkowego. W pracy Rodacka i wsp. 2010 wykazałam, że anionorodnik ponadtlenkowy generowany radiacyjnie lub chemicznie skutecznie inaktywuje GAPDH.

Do badań wybrałam 1,2-dihydroksy-3,5-benzenodisulfonian (tiron) oraz dwie naturalnie występujące pochodne stilbenowe: 3,5,4'-trihydroksy-trans-stilben (resweratrol) i 3,3',5,5'-tetrahydroksy-4'-metoksy-trans-stilben (THMS)² (rys. 5).

² THMS (3,3',5,5'-tetrahydroksy-4'-metoksy-trans-stilben) otrzymałam od prof. Wiesława Oleszka z Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach za pośrednictwem prof. Beaty Olas z Katedry Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego



Rys. 5. Struktura chemiczna: (a) resweratrolu, (b) THMS oraz (c) tironu (na podstawie prac Rodacka i wsp. 2014, 2015).

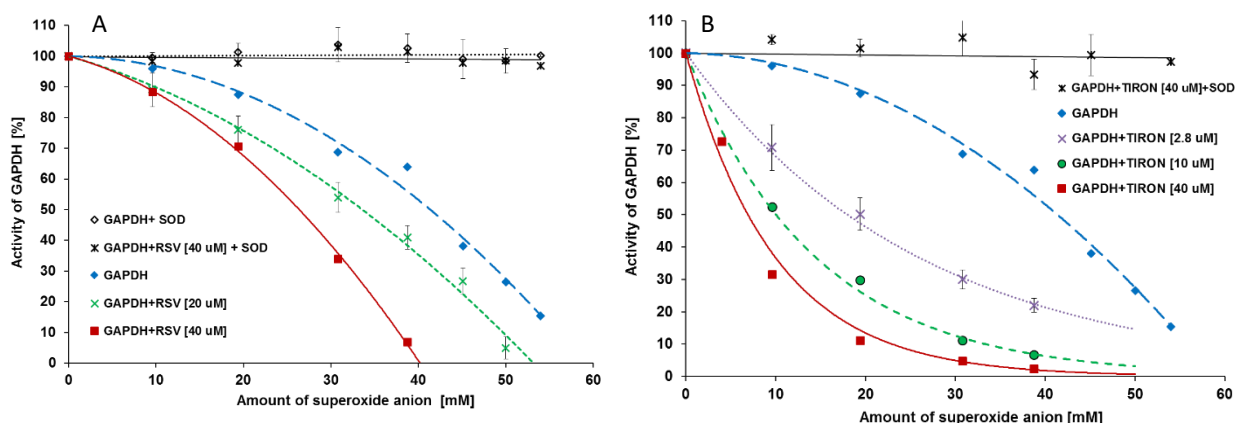
Spośród pochodnych stilbenowych dotychczas najlepiej poznane są właściwości biologiczne resweratrolu (Gerszon i wsp. 2014). THMS jest analogiem resweratrolu posiadającym dwie dodatkowe grupy hydroksylowe w pierścieniu B. Dodatkowo do grupy hydroksylowej w pozycji 4' dołączona jest grupa metoksylova. Pochodne stilbenowe są na ogół bardzo dobrymi antyoksydantami. Ich stałe szybkości reakcji z rodnikiem hydroksylowym są wysokie, rzędu 10^8 - 10^9 $M^{-1}s^{-1}$ natomiast stałe szybkości z anionorodnikiem ponadtlenkowym są średnio dwa rzędy wielkości niższe i wynoszą 10^6 - 10^7 $M^{-1}s^{-1}$ (Mahal i wsp. 2006; Stojanovic i wsp. 2001). Skutecznym antyoksydantem jest również tiron. Stała szybkości reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym jest o rząd wielkości wyższa w porównaniu do resweratrolu, wynosi 5×10^8 $M^{-1}s^{-1}$ (Greenstock i wsp. 1975).

W moich badaniach wykazałam, że tiron i resweratrol nie wpływały znacząco na aktywność i wybrane parametry struktury (reszty cysteinowe, zawartość struktur drugorzędowych) GAPDH (Rodacka i wsp. 2015). Wyraźną inaktywację dehydrogenazy obserwowałam natomiast pod wpływem THMS. W celu uzyskania odpowiedzi na pytanie dlaczego związki o podobnej budowie, resweratrol i THMS, różnie wpływają na aktywność GAPDH za pomocą programów i narzędzi bioinformatycznych przeprowadzono analizę najbardziej prawdopodobnych miejsc wiązania się obu pochodnych stilbenów w cząsteczce GAPDH. Wykazano, że w GAPDH jest 11 potencjalnych miejsc wiązania dla resweratrolu oraz 8 takich miejsc dla THMS. Oba związki mogą wiązać się w obszarze centrum aktywnego. Na podstawie analiz bioinformatycznych wykazaliśmy, że THMS w centrum aktywnym GAPDH wiąże się znacznie silniej niż resweratrol. Jego wiązanie w tym obszarze stabilizowane jest większą liczbą wiązań wodorowych niż wiązanie resweratrolu, ponadto jedno z wiązań wodorowych tworzy reszta cysteinowa w pozycji 149, która bierze bezpośrednio udział w reakcji katalizy. Stąd można sądzić, że różnica w aktywności GAPDH poddanej działaniu resweratrolu lub THMS związana jest z różną siłą oddziaływania tych związków w centrum aktywnym enzymu. Prawdopodobnie THMS jest znacznie trudniej wypierany przez substrat w reakcji katalizy w porównaniu z resweratrolem (Rodacka i wsp. 2015).

O silniejszym oddziaływaniu resweratrolu z cząsteczką GAPDH (11 potencjalnych miejsc wiązania) w porównaniu z THMS (8 potencjalnych miejsc wiązania) świadczą większe zmiany wartości potencjału zeta i intensywniejsze gaszenia fluorescencji tryptofanu w GAPDH pod wpływem resweratrolu niż pod wpływem THMS (Rodacka i wsp. 2015).

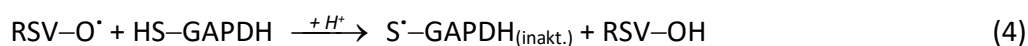
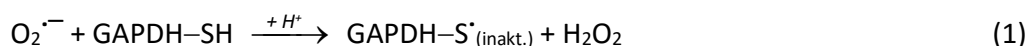
Żaden z badanych antyoksydantów nie chronił GAPDH przed inaktywacją wywołaną działaniem anionorodnika ponadtlenkowego. W układach $[GAPDH + \text{resweratrol} + O_2^{\cdot-}]$ oraz $[GAPDH + \text{tiron} + O_2^{\cdot-}]$ spadek aktywności dehydrogenazy był znacznie wyższy niż w układzie

[GAPDH + O₂^{•-}] (rys. 6). Nie obserwowałam znaczących różnic w aktywności enzymu poddanego działaniu anionorodnika w obecności THMS [GAPDH + THMS + O₂^{•-}], a aktywności enzymu poddanego działaniu samego anionorodnika ponadtlennkowego [GAPDH + O₂^{•-}]. We wszystkich badanych układach usunięcie anionorodnika ponadtlennkowego przez dysmutazę ponadtlennkową chroniło enzym przed inaktywacją. Równoległe z inaktywacją GAPDH w układach [GAPDH + resweratrol + O₂^{•-}] oraz [GAPDH + tiron + O₂^{•-}] obserwowałam zwiększone utlenianie wolnych grup SH oraz większe zmiany w zawartości struktur II-rzędowych w porównaniu z układem [GAPDH + O₂^{•-}] (Rodacka i wsp. 2015).



Rys. 6. Inaktywacja GAPDH pod wpływem anionorodnika ponadtlennkowego generowanego w reakcji chemicznej ksantyny z oksydazą ksantynową w obecności: A – resweratrolu, B- tironu (na podstawie Rodacka i wsp. 2014).

Jakie reakcje mogły zachodzić w badanych układach, które prowadziły do inaktywacji GAPDH? W reakcji GAPDH z anionorodnikiem ponadtlennkowym (reakcja 1) dochodziło do utlenienia reszt cysteinowych np. do kwasów sulfenowych lub powstawały wewnątrz- i międzycząsteczkowe mostki disiarczkowe. W konsekwencji następowała inaktywacja enzymu.



Jeśli w układzie obecny był resweratrol lub tiron to w reakcji z anionorodnikiem związki te ulegały przekształceniu w rodniki resweratrolowe lub tironowe (reakcja 2 i 3). Zakładając, że stałe szybkości reakcji tironu oraz resweratrolu z O₂^{•-} są rzędu 10⁷-10⁸ M⁻¹s⁻¹, a stała szybkości anionorodnika ponadtlennkowego z GAPDH wynosi 2×10⁷ M⁻¹s⁻¹ oszacowałam, że w badanych układach (stężenie GAPDH 1,4 μM, stężenie tironu i resweratrolu 40 μM lub 50 μM) około 90-95% generowanych anionorodników ponadtlennkowych reagowało z resweratrolem lub tironem przekształcając je w formy rodnikowe. W przypadku resweratrolu powstający rodnik preferencyjnie zlokalizowany był w pozycji 4' pierścienia B stilbenu. Wykazano, iż grupa hydroksylowa w tej pozycji wykazuje większy udział w zmiataniu rodników nadtlennkowych niż

grupy hydroksylowe w pozycji 3' i 5' (Caruso i wsp. 2004; Stojanović i wsp. 2001). Rodniki resweratrolowe w reakcji z GAPDH mogły m.in. utleniać reszty cysteinowe w centrum aktywnym bądź mogły się z nią związać. W konsekwencji zachodziła inaktywacja enzymu (reakcja 4 i 5). Analogiczne reakcje zachodziły w obecności rodnika tironowego. Większa efektywność rodników tironowych w inaktywacji GAPDH w porównaniu z rodnikami resweratrolowymi jest spowodowana prawdopodobnie większą reaktywnością anionorodnika ponadtlenkowego z tironem ($5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) niż z resweratrolom ($2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Ponadto cząsteczka tironu jest znacznie mniejsza i może łatwiej wnikać w głąb cząsteczki białka powodując większe uszkodzenia (Rodacka i wsp. 2014).

THMS różni się od resweratrolu tym, że w pierścieniu B obok dodatkowych dwóch grup OH, do grupy hydroksylowej w pozycji 4' dołączona jest grupa metoksylova (rys. 5). Wykazano, że metylacja grupy hydroksylowej w pozycji 4' resweratrolu znacznie obniża jego antyoksydacyjne właściwości (Stivala i wsp. 2001). Można więc oczekiwać, że THMS będzie wykazywał mniejszą reaktywność z anionorodnikiem ponadtlenkowym w porównaniu do resweratrolu. Ponieważ nieznana jest stała szybkości reakcji rodnika $\text{O}_2^{\cdot-}$ z THMS nie można jednoznacznie stwierdzić czy w układzie [GAPDH + THMS + $\text{O}_2^{\cdot-}$] enzym inaktywowany jest przez rodniki zlokalizowane na THMS, czy bezpośrednio przez anionorodnik ponadtlenkowy. Nawet jeśli w reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym powstają rodniki THMS to ich efektywność w inaktywacji GAPDH jest taka sama jak efektywność anionorodnika ponadtlenkowego (Rodacka i wsp. 2015).

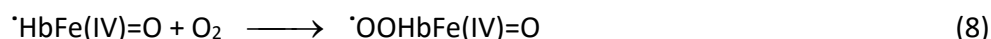
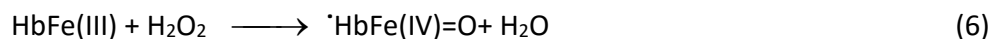
Na podstawie przeprowadzonych badań mogę stwierdzić, że:

1. Inaktywacja GAPDH pod wpływem THMS wynika z silnego oddziaływania (wiązania się) pochodnej stilbenowej w obszarze centrum aktywnego enzymu
2. Wtórne rodniki resweratrolu i tironu powstałe w reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym w większym stopniu inaktywują GAPDH niż sam anionorodnik ponadtlenkowy. W badanym układzie związki te wykazują więc właściwości prooksydacyjne.
3. Rodniki resweratrolu i tironu w większym stopniu utleniają reszty cysteinowe niż anionorodnik ponadtlenkowy.
4. Za prooksydacyjne właściwości resweratrolu odpowiada głównie grupa hydroksylowa w pozycji 4' stilbenu, z której w wyniku reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym dochodzi do oderwania atomu wodoru i utworzenia rodnika fenoksylowego.

3. Udział wtórnych rodników białkowych w inaktywacji badanych dehydrogenaz na przykładzie dehydrogenazy alkoholowej

Rezultaty moich badań oraz wyniki uzyskane przez innych autorów świadczą o tym, że badane w pracy dehydrogenazy wykazują różną wrażliwość na działanie rodnikowych i nierodnikowych produktów powstałych w reakcji białek i peptydów z reaktywnymi formami tlenu (Rahmanto i wsp. 2010; Kowalczyk i wsp. 2008; Morgan i wsp. 2002; Hampton i wsp. 2002; Headlam i wsp. 2006; Miura i wsp. 1997; Miura i wsp. 1995).

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi ocena w jakim stopniu wtórne rodniki białkowe i białka modyfikowane działaniem RFT uszkadzają dehydrogenazę alkoholową. Wtórne rodniki białkowe oraz białko oksydacyjnie zmodyfikowane generowałam w reakcji methemoglobiny (HbFe(III)) z H₂O₂. W pierwszym etapie tej reakcji powstają ferrylowe pochodne hemoglobiny z rodnikami białkowymi zlokalizowanymi w części globinowej (reakcja 6).

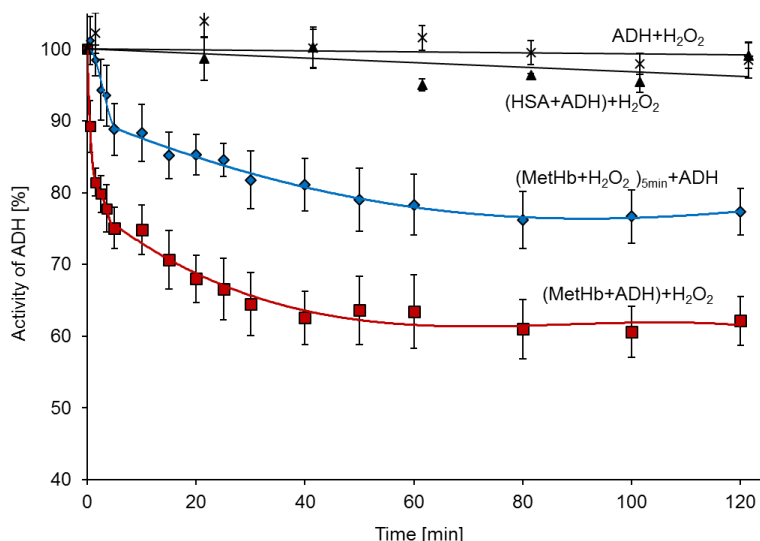


Wykazano, że rodniki w części białkowej powstają głównie na resztach: Tyr-24, Tyr-42 i His 20 w łańcuchu α oraz Tyr 35, Tyr 130, Cys 93 w łańcuchu β (Deterding i wsp. 2004). Rodniki te bardzo szybko zanikają w wewnątrz- i międzycząsteczkowych reakcjach. W obecności tlenu, powstają nadtlenkowe i następnie wodoronadtlenkowe pochodne ferrylowe hemoglobiny (reakcje 8, 9). Na podstawie widm EPR wykonanych w czasie dla układu [HbFe(III) + H₂O₂] już po około 45-60 sekundach obserwowałam zanik sygnału pochodzącego od produktów rodnikowych (dane własne niepublikowane). McArthur and Davies (1993) wykazali także, że okres półtrwania rodników w części globinowej wynosi około 50 sekund. Następnie powstaje nierodnikowa ferryhemoglobina (*HbFe(IV)=O) ze zmodyfikowaną częścią białkową (reakcja 7). W pracach innych autorów wykazano, iż w części globinowej utlenieniu ulegają reszty Cys 93 oraz Cys 112 w łańcuchu β , reszta Trp 15 w łańcuchu β ulega modyfikacji do pochodnych kinureinowych, na reszcie Met 55 w łańcuchu β powstaje sulfotlenek natomiast Ser 138 z łańcucha α tworzy wiązania krzyżowe z grupą hemową (Jia i wsp., 2007).

Aktywności ADH oznaczałam w dwóch układach:

- układ I [(metHb + ADH) + H₂O₂] - do mieszaniny methemoglobiny i dehydrogenazy dodawałam H₂O₂, mierzyłam aktywność enzymu w czasie,
- układ II [(metHb + H₂O₂)_{5min.} + ADH] - enzym dodawałam po 5-cio minutowej inkubacji methemoglobiny z H₂O₂, analogicznie jak w układzie I mierzyłam aktywność enzymu w czasie.

Na podstawie dodatkowych pomiarów wykluczyłam wpływ nadtlenu wodoru w stężeniu dodawanym do układu I i II na aktywność samej ADH oraz na aktywność ADH w obecności innego białka (HSA) (rys. 7) (Kowalczyk (Rodacka) i wsp. 2007).



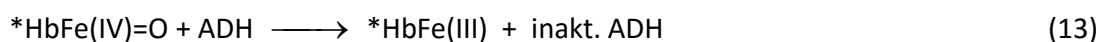
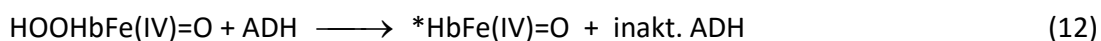
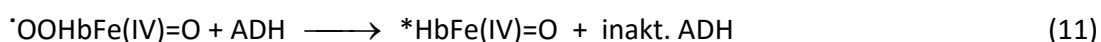
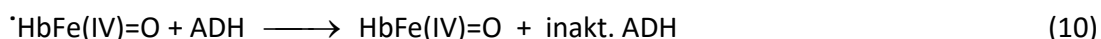
Rys. 7. Inaktywacja ADH w układach: [(metHb + ADH)+ H₂O₂], [(metHb + H₂O₂)_{5min.} + ADH], [(HSA + ADH)+ H₂O₂] oraz [ADH + H₂O₂] (na podstawie Kowalczyk (Rodacka) i wsp. 2007).

Zależność aktywności enzymu od czasu inkubacji w układzie I można opisać sumą trzech funkcji wykładniczych: $Ac(\%) = A_1e^{-k_1t} + A_2e^{-k_2t} + A_3e^{-k_3t}$, natomiast w układzie II zależność tę opisywała funkcja dwuwkładnicza, bez pierwszego komponentu: $Ac(\%) = A_2e^{-k_2t} + A_3e^{-k_3t}$. Na podstawie równań wykładniczych wyznaczyłam stałe szybkości inaktywacji ADH (k) oraz frakcje enzymu (A) ulegającą inaktywacji przy danej wartości k (tabela IV).

Tabela IV. Parametry wyznaczone na podstawie funkcji wykładniczych opisujących zależność aktywności ADH od czasu inkubacji w badanych układach (na podstawie publikacji Kowalczyk (Rodacka) i wsp. 2007).

	k_1 (min ⁻¹)	A_1 (%)	k_2 (min ⁻¹)	A_2 (%)	k_3 (min ⁻¹)	A_3 (%)	R^2
(metHb+ADH)+H ₂ O ₂	1,6818±0,4317	17,82±2,06	0,0894±0,0342	14,57±2,06	0,00134±0,00048	67,62±2,35	0,991
(metHb+H ₂ O ₂) _{5min} +ADH	-	0,00	0,1659±0,0428	14,22±1,45	0,00134±0,00026	85,78±1,31	0,975

W układzie pierwszym tj. [(metHb + ADH)+ H₂O₂] inaktywacja ADH była znacznie wyższa i zachodziła znacznie szybciej niż w układzie drugim (rys. 7). Wszystkie produkty reakcji metHb z nadtlakiem wodoru tzn. rodnikowe pochodne ferrylowe (reakcja 10), powstające w reakcji z tlenem nadtlakowe (reakcja 11) i wodoronadtlenkowe (reakcja 12) pochodne ferrylowe oraz nierodnikowe ferrylowe pochodne hemoglobiny (reakcja 13) oddziaływały z enzymem wpływając na jego aktywność.



W układzie drugim [(metHb + H₂O₂)_{5min.}+ADH] produkty rodnikowe ulegały całkowitej terminacji przed dodaniem ADH, a enzym ulegał inaktywacji głównie pod wpływem wodoronadtlenkowych pochodnych (reakcja 12) oraz nierodnikowej ferrylowej pochodnej hemoglobiny (reakcja 13). Nie wykluczone, że w niewielkim stopniu na aktywność enzymu wpływały także produkty nadtlenkowe (reakcja 11).

Wyznaczonym stałym szybkości inaktywacji enzymów (*k*) przypisałam odpowiednie reakcje. Stała *k*₁ wyznaczona tylko dla układu pierwszego charakteryzuje inaktywację ADH w bardzo krótkim czasie (1,5 min.) od dodania nadtlenku, odpowiada to reakcji 10 i 11. Stała *k*₂ odpowiada najprawdopodobniej reakcji 12 i w niewielkim stopniu reakcji 11. Stała *k*₃ odpowiada reakcji 13.

Podobne badania jak dla ADH przeprowadziłam dla pozostałych dwóch badanych przeze mnie dehydrogenaz. Inaktywację GAPDH obserwowałam zarówno pod wpływem rodnikowej jak i nierodnikowej ferrylowej pochodnej hemoglobiny, natomiast aktywność LDH obniżała się w niewielkim stopniu (ok. 10% po 120 min. inkubacji) tylko w układzie pierwszym, w którym enzym oddziaływał z rodnikowymi jak i nierodnikowymi produktami reakcji metHb z H₂O₂ (dane własne, niepublikowane). Na podstawie własnych badań oraz badań innych autorów dotyczących ferrylowych pochodnych mioglobiny (Miura i wsp. 1995, 1997) stwierdzam, że szczególnie wrażliwe na inaktywację pod wpływem wysokoutlenionych pochodnych białek hemowych są enzymy, które posiadają grupy tiolowe w centrach katalitycznych.

Przeprowadzone przeze mnie badania dowodzą, że ferrylowe pochodne hemoglobiny, które powstają w stanach zapalnych jak również w warunkach fizjologicznych (Svistunenko i wsp. 1997; Vollaard i wsp. 2005; Silva i wsp. 2009) mogą uszkadzać białka zaburzając w ten sposób metabolizm komórki. Na ich działanie szczególnie narażone są komórki śródbłonna naczyniowego (Silva i wsp. 2009; Potor i wsp. 2013).

Na podstawie przeprowadzonych badań mogę stwierdzić, że:

1. Nadtlenek wodoru ma znacznie mniejszy potencjał utleniający niż wysokoutlenione produkty jego reakcji z methemoglobiną (rodnikowe i nierodnikowe).
2. Rodnikowe jak i metastabilne formy ferrylowe hemoglobiny oddziałując z innymi białkami mogą powodować zmiany ich funkcji i struktury.

Wnioski ogólne

1. Za różną promieniowrażliwość badanych dehydrogenaz odpowiedzialne są głównie reszty cysteinowe, szczególnie te występujące w centrum aktywnym.
2. Destrukcja reszt tryptofanowych nie wpływa na zróżnicowanie promienioczułości badanych enzymów.
3. W enzymach posiadających grupy SH w centrach katalitycznych dużą efektywność w inaktywacji obok rodnika hydroksylowego wykazuje anionorodnik ponadtlenkowy.
4. W mniejszym stopniu na różną promienioczułość badanych dehydrogenaz wpływa liczba reszt aminokwasowych występujących na powierzchni cząsteczki najbardziej podatnych na tworzenie wodoronadtlenków.

5. Związki powszechnie uważane za skuteczne antyoksydanty mogą w pewnych układach wykazywać działanie prooksydacyjne, co wykazano na przykładzie wtórnych rodników organicznych zlokalizowanych na tironie i resweratrolu (rodniki resweratrolowe i tironowe wykazują silniejsze właściwości utleniające niż anionorodnik ponadtlenkowy).
6. Na podstawie danych literaturowych oraz przeprowadzonych przeze mnie doświadczeń można wnioskować, że za prooksydacyjne właściwości resweratrolu odpowiedzialny jest rodnik fenoksylový zlokalizowany w pozycji 4' stilbenu.
7. Podobnie wtórne rodniki organiczne zlokalizowane na białkach mogą być silniejszymi czynnikami utleniającymi niż indukujące je reaktywne formy tlenu (np. ferrylowe pochodne hemoglobiny w większym stopniu inaktywują ADH niż H₂O₂).

Wykorzystanie wyników

Uzyskane rezultaty opisują mechanizm zmian strukturalnych i funkcjonalnych dehydrogenaz pod wpływem reaktywnych form tlenu oraz wskazują elementy struktury w największym stopniu wpływające na różną promienioczułość tych białek. Wyniki przedstawionych badań mogą być pomocne w przewidywaniu podatności na wolnorodnikową inaktywację innych enzymów bez dodatkowych badań. Wskazanie niskocząsteczkowych związków skutecznie chroniących białka przed uszkodzeniami może mieć duże znaczenie w prewencji i leczeniu wielu chorób, w powstawaniu i przebiegu których istotną rolę odgrywają oksydacyjne modyfikacje białek, w tym chorób neurodegeneracyjnych. Jednakże badane związki uważane za bardzo dobre antyoksydanty mogą w pewnych układach wykazywać właściwości prooksydacyjne i dlatego powszechne ich stosowanie w celach prewencyjnych i leczniczych musi być poprzedzone dokładnymi badaniami.

Praca w części realizowana była w ramach projektu NCN (Opus nr 2012/05/B/NZ1/00701). Przedstawiona charakterystyka głównych produktów utleniania i określenie mechanizmu procesów oksydacyjnych modyfikacji dehydrogenaz są podstawą do planowanych w najbliższym czasie badań realizowanych w ww. projekcie. Badania te będą dotyczyły procesów agregacji GAPDH z białkami zaangażowanymi w procesy neurodegeneracyjne: α -synukleiny i białkiem tau.

Osiągnięcie i dorobek naukowy został pozytywnie oceniony przez Komisję Biochemiczno-Biofizyczną Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ w dniu 22 grudnia 2015 r.

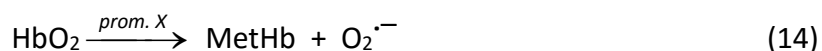
D) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania przed uzyskaniem stopnia doktora

Jestem absolwentką Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego (obecnie Wydział Biologii i Ochrony Środowiska). Studia ukończyłam w 1999 r. uzyskując tytuł magistra biologii w zakresie biofizyki. Pracę magisterską p.t. „Wpływ idarubicyny (IDA) i aldehydu glutarowego na właściwości erytrocytów człowieka” wykonałam w Katedrze Termobiologii pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Jóźwiak i opieką dr Agnieszki Szwarockiej (obecnie dr hab. Agnieszki Marczak, prof. nadzw. UŁ). Praca magisterska składała się z dwóch części. W pierwszej części (badania *in vitro*) badałam wpływ idarubicyny, aldehydu glutarowego oraz idarubicyny

w połączeniu z aldehydem glutarowym na potencjał błonowy oraz mikrolepkość wnętrza erytrocytów. Wykonane oznaczenia pozwoliły stwierdzić, że sama idarubicyna w niewielkim stopniu wpływała na mikrolepkość wnętrza i potencjał błonowy erytrocytów. Dużo wyższe zmiany badanych parametrów obserwowałam po inkubacji erytrocytów z samym aldehydem glutarowym lub z aldehydem w połączeniu z idarubicyną. W drugiej części pracy (badania *in vivo*) określałam zmiany właściwości błony komórkowej erytrocytów (płynność lipidów w powierzchniowych i hydrofobowych obszarach błony, zmiany konformacyjne białek błonowych) oraz mikrolepkość wnętrza erytrocytu po podaniu idarubicyny osobom chorym na ostrą białeczkę szpicową. Wykazałam, że idarubicyna w dawce 12 mg/m² nie powoduje istotnych statystycznie zmian badanych parametrów. Wyniki badań zostały opublikowane w 2 artykułach, w czasopismach z listy filadelfijskiej (Szwarcoka i wsp. 2001; Marczak i wsp. 2006).

W roku 1999 zostałam słuchaczką Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Cytogenetyki, Genetyki Molekularnej i Radiobiologii Uniwersytetu Łódzkiego. Pracę doktorską wykonałam w Zakładzie Radiobiologii Katedry Biofizyki Molekularnej pod kierunkiem prof. dr hab. Mieczysława Puchały. W 2002 roku zostałam zatrudniona na stanowisko asystenta w Zakładzie Radiobiologii Katedry Biofizyki Molekularnej UŁ. Tematyka badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej dotyczyła oddziaływań rodników białkowych zlokalizowanych na hemoglobinie (Hb) i albuminie człowieka (HSA) na dehydrogenazę alkoholową (ADH), dehydrogenazę mleczanową (LDH) oraz dehydrogenazę aldehydu-3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Oznaczenia te pozwoliły na określenie kierunku transferu rodników między białkami. Wykazałam, że wtórne rodniki albuminowe i hemoglobinowe wywołują znaczną inaktywację GAPDH i ADH. Rodniki albuminowe (HSA[•]) generowane radiacyjnie w atmosferze N₂O wykazują wyższą efektywność w inaktywują dehydrogenaz niż rodniki hemoglobinowe (Hb[•]). Odwrotną zależność obserwowałam gdy preparaty napromieniowywałam w atmosferze powietrza (w obecności O₂). Inaktywacja GAPDH i ADH była wyższa pod wpływem nadtlenkowych pochodnych hemoglobinowych niż nadtlenkowych pochodnych albuminowych. Zwiększoną inaktywację enzymów w tych warunkach mogły wywoływać ferrytowe pochodne hemoglobiny lub/i O₂^{•-} powstający dodatkowo w wyniku radiacyjnego utleniania żelaza hemowego (reakcja 14).



LDH nie ulegała inaktywacji pod wpływem rodników hemoglobinowych, albuminowych oraz nadtlenkowych pochodnych tych białek (Kowalczyk i wsp. 2008). Dodatkowo badania przeprowadzone podczas realizacji pracy doktorskiej pozwoliły mi wyznaczyć stałe szybkości reakcji rodników [•]OH z badanymi dehydrogenazami w warunkach radiolizy stacjonarnej (Kowalczyk i Puchała, 2003).

Wchodziłam w skład zespołu, który pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Gwoździńskiego w latach 1998 - 2003 prowadził badania fizykochemiczne wód jezior położonych w Tucholskim Parku Narodowym oraz Zaborskim Parku Krajobrazowym. Badania wskaźników klas czystości wód jeziornych dokonywaliśmy po zejściu lodów (marzec, kwiecień) oraz podczas stagnacji letniej (sierpień). W czasie stagnacji letniej wykonywaliśmy również ocenę profilu termiczno-tlenowego dla każdego z badanych jezior. Oceny klasy czystości wód badanych jezior ustalaliśmy na podstawie standardowych parametrów jakości wód określonych

przez Państwową Inspekcję Ochrony Środowiska. Wykazaliśmy, że jakość wód jeziornych w Parku Narodowym Bory Tucholskie jest dobra lub bardzo dobra. Zdecydowana większość wartości poszczególnych wskaźników zanieczyszczenia wód odpowiada I lub II klasie czystości. Najlepszą jakość wody mają bezodpływowe jeziora oligotroficzne: Gacno Małe, Gacno Wielkie, Głuche, Kocioł i Nierybno. Wody jeziora Krzywce Wielkie i Krzywce Małe zakwalifikowano do II klasy czystości (Gwoździński i wsp. 2001a). Wody Strugi Siedmiu Jezior generalnie zaliczono do II klasy czystości z wyjątkiem jeziora Ostrowite (klasa I) (Gwoździński i wsp. 1998, 2001b). Wyniki badań wód jezior położonych w Zaborskim Parku Krajobrazowym pozwoliły zaklasyfikować jeziora: Płęsno, Garliczno, Zmarłe, Nawionek, Czarne, Piecki do I klasy czystości, natomiast jeziora: Duże Głuche, Małe Głuche i Śluzę do II klasy czystości (Gwoździński i wsp. 2003a,b). Wyniki badań opublikowano w 8 pracach monograficznych. Z zakresu tych badań zespół otrzymał w 2003 roku nagrodę zespołową II stopnia Rektora Uniwersytetu Łódzkiego.

W 2003 roku odbyłam dwutygodniowy staż we Francji, w Stacji Morskiej Instytutu Fizjologii i Biologii Morza w Tamaris (filia Uniwersytetu w Lyonie) w ramach współpracy naukowej między Uniwersytetem Łódzkim a Uniwersytetem w Lyonie. W czasie tego pobytu badałam aktywność dehydrogenazy mleczanowej (jeden ze wskaźników oksydacyjnych uszkodzeń tkanek) w tkankach gruczołu pokarmowego pochodzącego z dwóch populacji małż *Mytilus galloprovincialis*: pochodzących z farmy hodowlanej oraz małż zebranych z zanieczyszczonych wód portu La Seyne sur mer położonego na wybrzeżu Morza Śródziemnego, w pobliżu miasta Tulon we Francji. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy Gwoździński i wsp. 2010.

Do czasu uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w specjalności biofizyka mój dorobek naukowy składał się z 2 prac oryginalnych opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, 8 prac doświadczalnych stanowiących rozdziały w monografiach. Ponadto wyniki badań prezentowałam w postaci 9 komunikatów zjazdowych, w tym 2 na konferencjach międzynarodowych.

Pracę doktorską zatytułowaną „Radiacyjna inaktywacja wybranych dehydrogenaz pod nieobecność i w obecności albuminy lub hemoglobiny” recenzowali: prof. dr hab. Grzegorz Bartosz z Katedry Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego oraz prof. dr hab. Stanisław Wysocki z Instytutu Podstaw Chemii Żywności Politechniki Łódzkiej. Decyzją Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego otrzymałam tytuł naukowy doktora nauk przyrodniczych w dyscyplinie biofizyka dnia 30.11.2004 roku.

Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania po uzyskaniu stopnia doktora, nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, od 1 lutego 2005 roku zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta i kontynuowałam badania nad wpływem reaktywnych form tlenu generowanych radiacyjnie oraz produktów powstałych w reakcji z reaktywnymi formami tlenu na właściwości strukturalne i funkcjonalne dehydrogenazy alkoholowej (ADH), dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego (GAPDH).

W pracy doktorskiej wykazałam iż rodniki hemoglobinowe generowane radiacyjnie inaktywują enzymy, które w centrum aktywnym posiadają reszty cysteinowe bezpośrednio zaangażowane w reakcję katalityczną (ADH i GAPDH). Zainspirowana tymi wynikami

przeprowadziłam badania, które jednoznacznie wykazały iż rodnikowe i nierodnikowe wysokoutlenione produkty reakcji hemoglobiny z nadtlakiem wodoru (ferrylowe pochodne hemoglobiny) wywołują znaczną inaktywację dehydrogenazy alkoholowej oraz dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, nie wpływają natomiast znacząco na aktywność dehydrogenazy mleczanowej. Włączyłam się także do badań, których celem było określenie wpływu methemoglobiny i ferrylowych pochodnych hemoglobiny na błonę komórkową erytrocytów człowieka. Wykazaliśmy, iż utlenione formy hemoglobiny indukują zmiany niektórych parametrów struktury (płynność dwuwarstwy lipidowej, konformacje białek błonowych) i właściwości błon erytrocytarnych (aktywność acetylocholinoesterazy). Pochodne ferrylowe inicjowały większe zmiany badanych parametrów niż methemoglobina (Sztiller i wsp. 2010).

Moje dalsze prace badawcze związane były z badaniem oddziaływań RFT z dehydrogenazami: ADH, GAPDH i LDH. Badania te wchodzą w skład osiągnięcia naukowego przedstawionego w postępowaniu habilitacyjnym, zostały opisane w poprzednim rozdziale. Przegląd literatury naukowej dotyczącej podjętej tematyki badawczej wzbudził moje szczególne zainteresowanie dehydrogenazą aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Jest to niezwykle interesujący enzym, zaangażowany w wiele niezależnych procesów komórkowych. W pracach innych autorów wykazano iż GAPDH tworzy neurotoksyczne agregaty białkowe, w skład których mogą wchodzić inne białka globularne (np. kinaza keratynowa, dehydrogenaza mleczanowa) jak i białka inherentnie nieuporządkowane (ang. *Intrinsically Disorder Proteins, IDPs*) takie jak: białko tau, alfa-synukleina, białka prionowe (Itakura i wsp. 2015; Butterfield i wsp. 2010; Cumming i Schubert 2005). Białka wewnątrznie nieuporządkowane charakteryzują się brakiem ustalonej struktury trzeciorzędowej. Najczęściej występują jako zespół struktur pozostających ze sobą w równowadze. Dużo częściej niż białka globularne ulegają procesom błędnego fałdowania i agregacji. Dlatego też wiele białek z grupy IDPs jest zaangażowanych w patogenezę chorób neurodegeneracyjnych. Charakterystykę białek inherentnie nieuporządkowane przedstawiono w pracy Strumiłło i wsp. 2014, w której jestem współautorem.

Poza głównym tematem realizowanych przeze mnie badań wchodzących w skład osiągnięcia uczestniczyłam także w badaniach dotyczących zastosowania etanolu, mannitolu i melatoniny do ochrony erytrocytów przed stresem oksydacyjnym generowanym radiacyjnie i chemicznie. W badaniu wpływu mannitolu lub etanolu na uszkodzenia erytrocytów człowieka inicjowane radiacyjnie oraz podczas przedłużonej inkubacji wykazaliśmy, iż badane alkohole w różny sposób oddziałują na krwinki czerwone. Mannitol dodawany do zawiesiny erytrocytów tuż po zakończeniu napromieniowania zmniejszał poradiacyjną hemolizę erytrocytów. Etanol nie wpływał na poziom hemolizy, natomiast hamował utlenianie hemoglobiny i utlenianie glutationu. Badane alkohole nie wpływały na degradację spektryny i białka pasma 3 oraz na tworzenie agregatów białkowych w bonie erytrocytarnej (oznaczenia metodą SDS-PAGE) (Krokosz i wsp. 2008). W kolejnych badaniach sprawdzaliśmy w jaki sposób melatonina wpływa na oksydacyjne uszkodzenia erytrocytów człowieka podczas przedłużonej inkubacji (inkubacja dłuższa niż 24 godz. w temp. 37°C). W tym przypadku działanie melatoniny z jednej strony chroniło erytrocyty przed hemolizą oraz przed peroksydacją lipidów błonowych, z drugiej zaś strony obserwowaliśmy wzmożone utlenianie hemoglobiny i wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (Krokosz i wsp. 2013).

Ponadto włączyłam się do badań, w których określaliśmy wpływ fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ (hydroksylowa pochodna fulereny C_{60}) na izolowane białko (dehydrogenazę alkoholową) oraz na ludzkie komórki jednojądrzaste krwi obwodowej poddane działaniu promieniowania jonizującego w celu określenia jego antyoksydacyjnych/prooksydacyjnych właściwości. Wykazaliśmy, że sam fulerenol nie zmienia aktywności ADH, natomiast chroni enzym przed znaczną inaktywacją wywołaną działaniem produktów radiolizy wody generowanych w atmosferze powietrza (Krokosz i wsp. 2014). Fulerenol w niewielkim stopniu wpływał na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka poddane działaniu promieniowania jonizującego. Oddziaływał głównie z powierzchniowymi obszarami błony komórkowej, prawdopodobnie nie wnikał do wnętrza komórek (Nowak i wsp. 2014).

W roku 2013 i 2014 odbyłam dwa dwutygodniowe staże naukowe w Katedrze Fizyki Jądrowej i Biofizyki Uniwersytetu im. Komeńskiego w Bratysławie (Słowacja) oraz w Instytucie Biofizyki i Inżynierii Komórki, Białoruskiej Akademii Nauk w Mińsku (Białoruś). Badałam oddziaływanie pomiędzy modelowymi błonami lipidowymi a dendrymerami trzeciej i czwartej generacji skompleksowanymi z peptydami HIV (Gp160, Gag-P24, Nef).

Obecnie kontynuuję badania w ramach projektu NCN (Opus nr 2012/05/B/NZ1/00701). Prowadzę także badania dotyczące wpływu pochodnych stilbenowych (resweratrolu, piceatannolu, piceidu) na komórki neuroblastomy (Neuro-2a) oraz komórki hipokampalne (mHippoE-18) w warunkach stresu oksydacyjnego. Wyniki dotyczące tej tematyki zamieściłam w publikacji pt. „Effects of resveratrol on Neuro-2a and mHippoE-18 cells” (praca w recenzji) oraz prezentowałam na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Mój dorobek naukowy po obronie pracy doktorskiej obejmuje 14 prac oryginalnych, 6 recenzowanych prac przeglądowych. Część wyników została również zaprezentowana na zjazdach krajowych i międzynarodowych (26 komunikatów konferencyjnych).

Całkowity mój dorobek naukowy obejmuje 30 publikacji, w tym 19 prac opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej oraz 11 prac monograficznych. Ponadto byłam współautorem 38 doniesień konferencyjnych (w tym 16 na konferencjach międzynarodowych).

Literatura

- Auld DS, Bergman T. 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: The role of zinc for alcohol dehydrogenase structure and function. *Cell Mol Life Sci.*, 65, 3961-3970.
- Beal MF. 2002. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Rad. Biol. Med.* 32, 797–803.
- Bhullar KS, Rupasinghe HP. 2013. Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev.*, 2013, ID 891748.
- Bielski BHJ, Cabelli DE, 1995. Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solutions. In: Foote, CS, Valentine JS, Greenberg A, Liebman JF (Eds.), *Active Oxygens in Chemistry*. Blackie Academic & Professional, London, 66–104.
- Butterfield DA, Hardas SS, Lange ML. 2010. Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease: many pathways to neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis.*, 20, 369-393.
- Buxton GV, Greenstock CL, Helman WP, Ross AB. 1988. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons. Hydrogen atoms and hydroxyl radicals (OH/O) in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 17, 513–886.
- Caruso F, Tanski J, Villegas-Estrada A, Rossi M. 2004. Structural Basis for Antioxidant Activity of trans-Resveratrol: Ab Initio Calculations and Crystal and Molecular Structure. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7279–7285.
- Chuang DM, Hough C, Senatorov VV. 2005. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 269-290.
- Cook NL, Pattison DI, Davies MJ. 2012. Myeloperoxidase-derived oxidants rapidly oxidize and disrupt zinc-cysteine/histidine clusters in proteins. *Free Radic. Biol. Med.*, 53, 2072-2080.
- Cumming RC, Schubert D. 2005. Amyloid- β induces disulfide bonding and aggregation of GAPDH in Alzheimer's disease. *FASEB J.*, 19, 2060-2062.
- Davies MJ. 2005. The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta*, 1703, 93-109.
- Dempster S, Harper S, Moses JE, Dreveny I. 2014. Structural characterization of the apo form and NADH binary complex of human lactate dehydrogenase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 70, 1484-90.
- Deterding LJ, Ramirez DC, Dubin JR, Mason RP, Tomer KB. 2004. Identification of free radicals on hemoglobin from its self-peroxidation using mass spectrometry and immuno-spin trapping: observation of a histidinyl radical. *J. Biol. Chem.*, 279, 11600–11607.
- Du J, Gebicki JM. 2004. Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2334-43.
- Gebicki JM. 2006. The role of proteins in biological damage induced by oxidative stress. In: Pietzsch, J. (Ed.), *Protein Oxidation and Disease, Research Signpost*, pp. 7-38.
- Gebicki S, Gebicki JM. 1993. Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem. J.* 289:743-749.
- Gerszon J, Rodacka A, Puchała M. 2014. Antioxidant properties of resveratrol and its protective effects in neurodegenerative diseases. *Advances in Cell Biology*. 4 (2), 97-117.
- Greenstock CL, Miller RW. 1975. The oxidation of tiron by superoxide anion. Kinetics of the reaction in aqueous solution in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.*, 396(1), 11-16.
- Grimm S, Hoehn A, Davies KJ, Grune T. 2011. Protein oxidative modifications in the ageing brain: consequence for the onset of neurodegenerative disease. *Free Radic. Res.* 45(1), 73-88.
- Gwoździński K, Gonciarz M, Grzelak A, Kowalczyk A, Kilańczyk E, Pieniążek A, Sztiller M. Ocena czystości wód wybranych jezior na terenie Borów Tucholskich. W monografii: „Bory Tucholskie - Ochrona Biosfery”, red. K. Gwoździński, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 1998, 31-42.

- Gwoździński K, Gonciarz M, Kilańczyk E, Kowalczyk A, Pieniążek A, Brichon G. 2010. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in *Mytilus galloprovincialis* from the French Mediterranean coast. *Oceanol. Hydrobiol. St.*, 39(4), 33-43.
- Gwoździński K, Gonciarz M, Kowalczyk A, Kilańczyk E, Pieniążek A, Sztiller M. Klasy czystości wybranych jezior na terenie Parku Narodowego Bory Tucholskie. W monografii: „Bory Tucholskie - zasoby i ich ochrona”, red. K. Gwoździński, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 2001a. 126-138.
- Gwoździński K, Gonciarz M, Kowalczyk A, Kilańczyk E, Pieniążek A, Sztiller M. Klasy czystości wód Strugi Siedmiu Jezior. W monografii: „Bory Tucholskie - zasoby i ich ochrona”, red. K. Gwoździński, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 2001b, 152-164.
- Gwoździński K, Gonciarz M, Kowalczyk A, Kilańczyk E, Pieniążek A, Sztiller M. Klasy czystości wód wybranych jezior Zaborskiego Parku Krajobrazowego. W monografii: „Bory Tucholskie II - zasoby i ich ochrona”, red. K. Gwoździński, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 2003b, 33-47.
- Gwoździński K, Gonciarz M, Kowalczyk A, Kilańczyk E, Pieniążek A, Sztiller M. Badania fizykochemiczne wód jezior położonych w północno-zachodniej części Zaborskiego Parku Krajobrazowego. W monografii: „Bory Tucholskie II - zasoby i ich ochrona”, red. K. Gwoździński, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 2003a, 23-32.
- Hampton MB, Morgan PE, Davies MJ. 2002. Inactivation of cellular caspases by peptide-derived tryptophan and tyrosine peroxides. *FEBS Lett.* 527, 289–292.
- Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD, Ferris CD, Hayward SD, Snyder SH, Sawa A. 2005. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.*, 7, 665-674.
- Hara MR, Cascio MB, Sawa A. 2006. GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochim Biophys Acta.* 1762, 502-509.
- Headlam HA, Gracanin M, Rodgers KJ, Davies MJ. 2006. Inhibition of cathepsins and related proteases by amino acid, peptide, and protein hydro- peroxides. *Free Radical. Biol. Med.*, 40, 1539–1548.
- Hildebrandt T, Knuesting J, Berndt C, Morgan B, Scheibe R. 2015. Cytosolic thiol switches regulating basic cellular functions: GAPDH as an information hub? *Biol. Chem.*, 396, 523-37.
- Houée-Levin C, Bobrowski K, Horakova L, Karademir B, Schouneich C, Davies MJ, Spickett CM. 2015. Exploring oxidative modifications of tyrosine: an update on mechanisms of formation, advances in analysis and biological consequences. *Free Radic. Res.* 49, 347–73.
- Houée-Levin C, Bobrowski K. 2013. The use of the methods of radiolysis to explore the mechanisms of free radical modifications in proteins. *J Proteomics*, 92, 51-62.
- Huang J, Hao L, Xiong N, Cao X, Liang Z, Sun S, Wang T. 2009. Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rotenone-induced cell apoptosis: relevance to protein misfolding and aggregation. *Brain Res.*, 1279, 1-8.
- Huang J, Xiong N, Chen C, Xiong J, Jia M, Zhang Z, Cao X, Liang Z, Sun S, Lin Z, Wang T. 2011. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: activity inhibition and protein overexpression in rotenone models for Parkinson's disease. *Neuroscience.* 192, 598-608
- Hwang NR, Yim SH, Kim YM, Jeong J, Song EJ, Lee Y, Lee JH, Choi S, Lee KJ. 2009. Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions. *Biochem. J.*, 423, 253-264.
- Itakura M, Nakajima H, Kubo T, Semi Y, Kume S, Higashida S, Kaneshige A, Kuwamura M, Harada N, Kita A, Azuma YT, Yamaji R, Inui T, Takeuchi T. 2015. Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Aggregates Accelerate Amyloid- β Amyloidogenesis in Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.*, 290 (43), 26072-87.
- Itakura M, Nakajima H, Semi Y, Higashida S, Azuma YT, Takeuchi T. 2015. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregation inhibitor peptide: A potential therapeutic strategy against oxidative stress-induced cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 467 (2), 373-6.

- Jia Y, Buehler PW, Boykins RA, Venable RM, Alayash AI. 2007. Structural basis of peroxide-mediated changes in human hemoglobin: a novel oxidative pathway. *J. Biol. Chem.*, 282 (7), 4894-907.
- Jimenez-Aliaga K, Bermejo-Bescas P, Benedi J, Martin-Aragon S. 2011. Quercetin and rutin exhibit anti-amyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APP_{sw} cells. *Life Sci.*, 89, 939-945.
- Kowalczyk A, Puchała M. 2003. The rate constants of the reaction of hydroxyl radicals (OH) with alcohol dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 8 (3), 841-848.
- Kowalczyk A, Serafin E, Puchała M. 2008. Inactivation of chosen dehydrogenases by the products of water radiolysis and secondary albumin and haemoglobin radicals. *Int. J. Radiat. Biol.*, 84, 15-22.
- Krokosz A, Grebowski J, Rodacka A, Pasternak B, Puchała M. 2014. The effect of fullerene C₆₀(OH)_{~30} on alcohol dehydrogenase activity irradiated with X-rays. *Rad. Phys. Chem.*, 97 (4), 102-106.
- Krokosz A, Grebowski J, Rodacka A, Szweida-Lewandowska Z, Puchała M. 2013. Can melatonin delay oxidative damage of human erythrocytes during prolonged incubation? *Advances in Medical Sciences*. 58 (1), 134-142.
- Krokosz A, Rodacka A, Szweida-Lewandowska Z, Puchała M. Wpływ wybranych alkoholi na uszkodzenia erytrocytów człowieka inicjowane RFT. W monografii: „Błony Biologiczne”, red. J. Gabrielska i P. Misiak, 2008, 225-228
- Lin MM, Shorokhov D, Zewail AH. 2014. Dominance of misfolded intermediates in the dynamics of α -helix folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 111 (40), 14424-9.
- Mahal HS, Mukherjee T. 2006. Scavenging of reactive oxygen radicals by resveratrol: antioxidant effect. *Res. Chem. Intermed.*, 32 (1), 59-71.
- Marczak A, Kowalczyk A, Wrzesien-Kus A, Robak T, Jozwiak Z. 2006. Interaction of doxorubicin and idarubicin with red blood cells from acute myeloid leukaemia patients. *Cell Biol. Int.*, 30 (2), 127-32.
- McArthur KM, Davies MJ. 1993. Detection and reactions of the globin radical in haemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*. 1202, 173-181.
- Men L, Wang Y. 2007. The oxidation of yeast alcohol dehydrogenase-1 by hydrogen peroxide in vitro. *J. Proteome. Res.* 6, 216-225.
- Meredith SC. 2005. Protein denaturation and aggregation: Cellular responses to denatured and aggregated proteins. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1066, 181-221.
- Miura T, Muraoka S, Ogiso T. 1995. Relationship between protein damage and ferrylmyoglobin. *Biochem. Mol. Int.*, 36, 587-594.
- Miura T, Muraoka S, Ogiso T. 1997. Inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by ferrylmyoglobin. *Chemico-Biological Int.* 107, 173-183.
- Morgan PE, Dean RT, Davies MJ. 2002. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen attack. *Eur. J. Biochem.*, 269, 1916-1925
- Mozziconacci O, Mirkowski J, Rusconi F, Pernot P, Bobrowski K, Houe'e-Levin C. 2007. Superoxide radical anions protect enkephalin from oxidation if the amine group is blocked. *Free Radic. Biol. Med.*, 43, 229-240.
- Nakajima H, Amano W, Fukuhara A, Kubo T, Misaki S, Azuma YT, Inui T, Takeuchi T. 2009. An aggregate-prone mutant of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase augments oxidative stress-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390, 1066-1071.
- Nakajima H, Amano W, Kubo T, Fukuhara A, Ihara H, Azuma YT, Tajima H, Inui T, Sawa A, Takeuchi T. 2009. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregate formation participates in oxidative stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.*, 284, 34331-34341.
- Nakamura T, Lipton SA. 2009. According to GOSPEL: filling in the GAPDH of NO-mediated neurotoxicity. *Neuron*, 63, 3-6.

- Naletova I, Schmalhausen E, Kharitonov A, Katrukha A, Saso L, Caprioli A, Muronetz V. 2008. Non-native glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase can be an intrinsic component of amyloid structures. *Biochim. Biophys. Acta*, 1784, 2052-2058.
- Nowak KE, Krokosz A, Rodacka A, Puchala M. 2014. Study on the effect of polyhydroxylated fullerene, C60(OH)36 on X-ray irradiated human peripheral blood mononuclear cells. *Rad. Phys. Chem.*, 97 (4), 325-331.
- Peskin AV, Cox AG, Nagy P, Morgan PE, Hampton MB, Davies MJ, Winterbourn CC. 2010. Removal of amino acid, peptide and protein hydroperoxides by reaction with peroxiredoxins 2 and 3. *Biochem. J.* 432, 313-321.
- Potor L, Bányai E, Becs G, Soares MP, Balla G, Balla J, Jeney V. 2013. Atherogenesis may involve the prooxidant and proinflammatory effects of ferryl hemoglobin. *Oxid Med Cell Longev.* 2013, ID 676425.
- Rahmanto AS, Morgan PE, Hawkins CL, Davies MJ. 2010. Cellular effects of peptide and protein hydroperoxides. *Free Radic. Biol. Med.*, 48, 1071-1078.
- Rodacka A, Gerszon J, Puchała M. 2014. Biologiczne znaczenie oksydacyjnych modyfikacji reszt cysteinowych w białkach na przykładzie dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego. *Postępy Hig. Med. Dosw.*, 68, 280-290.
- Rodacka A, Kałużna-Kos M, Krokosz A, Puchała M. „Conformational changes in irradiated dehydrogenases determined on the basis of quenching of thryptophan fluorescence.” XIV Conference of Polish Biophysics Society, Łódź, 28-30.09. 2010
- Rodacka A, Serafin E, Bubinski M, Krokosz A, Puchala M. 2012. The influence of oxygen on radiation-induced structural and functional changes in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase. *Rad. Phys. and Chem.*, 81, 807-815.
- Rodacka A, Serafin E, Puchala M. 2010. Efficiency of superoxide anions in the inactivation of selected dehydrogenases. *Rad. Phys. Chem.*, 79, 960-965
- Rodacka A, Strumillo J, Serafin E, Puchala M. 2015. Analysis of Potential Binding Sites of 3,5,4'-Trihydroxystilbene (Resveratrol) and trans-3,3',5,5'-Tetrahydroxy-4'-methoxystilbene (THMS) to the GAPDH Molecule Using a Computational Ligand-Docking Method: Structural and Functional Changes in GAPDH Induced by the Examined Polyphenols. *J. Phys. Chem. B*, 119 (30), 9592-9600.
- Rodacka A. 2013. Właściwości i różnorodność funkcjonalna dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego. *Postępy Hig. Med. Dosw.*, 67, 775-789.
- Rodacka A. 2015. The effect of radiation-induced reactive oxygen species (ROS) on the structural and functional properties of yeast alcohol dehydrogenase (YADH). *International Journal of Radiation Biology*, DOI: 10.3109/09553002.2015.1106022.
- Rodacka A, Strumillo J, Serafin E, Puchala M. 2014. Effect of resveratrol and tiron on the inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by superoxide anion radical. *Curr. Med. Chem.*, 21, 1061-1069.
- Rodríguez-Pascual F, Redondo-Horcajo M, Magán-Marchal N, Lagares D, Martínez-Ruiz A, Kleinert H, Lamas S. 2008. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates endothelin-1 expression by a novel, redox-sensitive mechanism involving mRNA stability. *Mol. Cell Biol.*, 7139-7155.
- Schüssler H, Puchala M. 2004. Oxygen effect in the radiolysis of proteins: V. Histones. *Rad. Phys. Chem.* 69, 45-53
- Seidler NW. 2013. Basic biology of GAPDH. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 985, 1-36.
- Sen N, Hara MR, Ahmad AS, Cascio MB, Kamiya A, Ehmsen JT, Agrawal N, Hester L, Doré S, Snyder SH, Sawa A. 2009. GOSPEL: a neuroprotective protein that binds to GAPDH upon S-nitrosylation. *Neuron*, 63, 81-91.
- Sen N, Hara MR, Kornberg MD, Cascio MB, Bae BI, Shahani N, Thomas B, Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH, Sawa A. 2008. Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, 10, 866-873.
- Silva G, Jeney V, Chora A, Larsen R, Balla J, Soares MP. 2009. Oxidized hemoglobin is an endogenous proinflammatory agonist that targets vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 284(43), 29582-95.

- Sirover MA. 2011. On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochim. Biophys. Acta*, 1810, 741-751.
- Stadtman ER. 2001. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.*, 928, 22-38.
- Stadtman ER. 2004. Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.*, 11(9), 1105-12.
- Stivala LA, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, Forti L, Pagnoni UM, Albini A, Prosperi E, Vannini V. 2001. Specific Structural Determinants Are Responsible for the Antioxidant Activity and the Cell Cycle Effects of Resveratrol. *J. Biol. Chem.*, 276, 22586–22594.
- Stojanović S, Sprinz H, Brede O. 2001. Efficiency and Mechanism of the Antioxidant Action of trans-Resveratrol and Its Analogues in the Radical Liposome Oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 391, 79– 89.
- Strumiłło J, Bartczak M, Rodacka A. „Określenie wpływu piceatannolu na funkcję dehydrogenazy mleczanowej i dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego w warunkach stresu oksydacyjnego generowanego radiacyjnie. *BioOpen* 2015, Łódź, 20-22 kwietnia, 2015;
- Strumiłło J, Gerszon J, Rodacka A. 2015. Charakterystyka związków fenolowych pochodzenia naturalnego ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w prewencji chorób neurodegeneracyjnych. W monografii: „Bory Tucholskie i inne obszary leśne. Ochrona i monitoring”, red. K. Gwoździński, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 231-246.
- Strumiłło J, Rodacka A, Puchala M. 2013. Związek między nieuporządkowaniem strukturalnym a funkcją w białkach inherentnie nieuporządkowanych. *Postępy Biologii Komórki*, 2013, 40 (4), 601-632.
- Svistunenko DA, Patel RP, Voloshchenko SV, Wilson MT. 1997. The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood. *J. Biol. Chem.* 272, 7114–7121.
- Sztiller M, Puchala M, Kowalczyk A, Bartosz G. 2006. The influence of ferrylhemoglobin and methemoglobin on the human erythrocyte membrane. *Redox Report*, 11 (6), 263-271.
- Szwarocka A, Kowalczyk A, Łubgan D, Józwiak Z. 2001. The combined effect of IDA and glutaraldehyde on the properties of human erythrocytes. *Int. J. Pharm.*, 220 (1-2), 43-51.
- Vollaard NB, Reeder BJ, Shearman JP, Menu P, Wilson MT, Cooper CE. 2005. A new sensitive assay reveals that hemoglobin is oxidatively modified in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, 39, 1216–1228.
- Wang Q, Woltjer RL, Cimino PJ, Pan C, Montine KS, Zhang J, Montine TJ. 2005. Proteomic analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer disease identifies GAPDH as a detergent-insoluble paired helical filament tau binding protein. *FASEB J.*, 19, 869-871.
- Winterbourn CC, Hampton MB. 2008. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, 45, 549-561.