

## STRESZCZENIE

Śródbłonek naczyniowy tworzy warstwa wyspecjalizowanych komórek wyściełająca wewnętrzne ściany naczyń krwionośnych. Będąc narządem wydzielniczym, śródbłonek moduluje odpowiedź zapalną, reguluje przepływ krwi i przepuszczalność naczyń oraz utrzymuje równowagę między krzepnięciem i fibrynolizą, a także odgrywa istotną rolę w procesach angiogenezy oraz w regulacji ciśnienia krwi. Ze względu na swoje umiejscowienie w organizmie stanowi on jedną z pierwszych barier chroniących przed czynnikami patogennymi krążącymi we krwi, w tym lipopolisacharydem (LPS). LPS jest silnym induktorem odpowiedzi zapalnej i jego działanie jest szeroko badane w kontekście sepsy, którą wywołuje. Ciekawym, a zarazem stosunkowo mało dyskutowanym w piśmiennictwie enzymem, który wydaje się mieć wpływ na procesy zapalne w organizmie jest N-metylotransferaza nikotynoamidowa (NNMT) katalizująca przeniesienie reszty metylowej z S-adenozylometioniny (SAM) na amid kwasu nikotynowego. Udział NNMT w odpowiedzi na stres oraz w stanie zapalnym związanym z różnorodnymi zaburzeniami został udowodniony na różnych modelach *in vitro* i *in vivo*, ale jego rola w śródbłonku w szczególności w kontekście sepsy jest słabo poznana.

Niniejsza rozprawa składa się z dwóch części. W pierwszej skoncentrowano się na scharakteryzowaniu odpowiedzi niezmiennych komórek HAEC na LPS podawany w warunkach stężenia i czasu traktowania na tyle łagodnych by uzyskać typową prozapalną odpowiedź komórek, ale nie wystarczających do zmniejszenia ich przeżywalności. Takie podejście pozwala na zminimalizowaniu dodatkowych nieodwracalnych skutków utrudniających rozpoznanie i interpretację procesów adaptacyjnych. Część uzyskanych wyników była zgodna z oczekiwaniami i potwierdziła wcześniej znane efekty oraz poprawność ustalonego modelu, natomiast część stanowiła nowe obserwacje dotyczące odwracalności zmian organizacji sieci mitochondrialnej oraz profilu metabolitów glikolizy i cyklu kwasów trikarboksylowych oraz szybkości oddychania komórek. Na szczególną uwagę zasługuje ustalenie, że traktowanie komórek HAEC LPS powoduje istotne zwiększenie ilości NNMT. Ta całkowicie nowa obserwacja stała się inspiracją do podjęcia badań opisanych w drugiej części rozprawy.

Ich celem było sprawdzenie czy obecność białka NNMT pozostaje w związku z obserwowanymi zmianami indukowanymi przez LPS. Zastosowano technikę siRNA w celu wyciszenia genu *NNMT* i wykazano, że odpowiedź na LPS komórek ze zmniejszonym

poziomem tego enzymu była w wielu aspektach wyraźnie złagodzona. Dotyczyło to zmniejszenia stresu oksydacyjnego, zmian architektury sieci mitochondrialnej oraz stymulowanego przez LPS wzrostu zawartości białek Opa1 i Mnf1 odpowiedzialnych za fuzję mitochondriów oraz białka Fis1 uczestniczącego w ich fragmentacji. Co więcej, w komórkach z wyciszonym *NNMT* normalizacja poziomu metabolitów glikolizy i cyklu Krebsa w komórkach traktowanych LPS była znacznie przyspieszona. Ponadto, wyciszenie *NNMT* zapobiegało wzmożonej aktywacji pojemnościowego napływu jonów wapnia obserwowanej w komórkach z niezmienioną ekspresją tego genu traktowanych LPS oraz wydaje się, że sprzyja normalizacji procesu autofagii oraz aktywacji stresu siateczki śródplazmatycznej.

Nie udało się powiązać zmian spowodowanych podaniem LPS z oczekiwanymi i bezpośrednimi skutkami związanymi z obniżeniem poziomu białka i aktywności *NNMT* jakimi są zwiększenie poziomu SAM oraz ograniczanie ilości  $\text{NAD}^+$  w komórkach. W pierwszym przypadku działanie samego LPS maskowało oczekiwany wynik, a w drugim obecność nikotynamidu w pożywce nie pozwalała na ewentualne powstanie deficytu  $\text{NAD}^+$ . A zatem wyjaśnienie mechanizmu biochemicznego wiążącego aktywność *NNMT* ze skutkami działania LPS w komórkach HAEC wymaga dalszych badań. Niemniej w niniejszej rozprawie zgromadzono szereg całkowicie nowych obserwacji, które poza aspektem poznawczym mogą dać podstawę do badań aplikacyjnych.

## ABSTRACT

The vascular endothelium is a layer of specialized cells that lines the inner walls of all blood vessels. As a secretory organ, the endothelium modulates the inflammatory response, regulates blood flow, controls vascular permeability and the balance between coagulation and fibrinolysis, and also plays an important role in the processes of angiogenesis and in the regulation of blood pressure. Due to its location, it constitutes one of the first protective barriers against pathogenic factors circulating in the blood, including lipopolysaccharide (LPS). LPS is a strong inducer of the inflammatory response and is widely studied in the context of the sepsis it causes. An interesting, yet little discussed, factor that seems to influence inflammatory processes in the body is the enzyme nicotinamide N-methyltransferase (NNMT), which catalyzes the transfer of the methyl residue from S-adenosylmethionine (SAM) to nicotinic acid amide. The involvement of NNMT in the response to stress and inflammation associated with various disorders has been proven in numerous *in vitro* and *in vivo* models, but its role in the endothelium, especially in the context of sepsis, is poorly understood.

This dissertation consists of two parts. The first one focused on characterizing the response of unchanged HAEC cells to LPS administered under conditions of concentration and treatment time mild enough to obtain the typical pro-inflammatory response of the cells, but not sufficient to reduce their survival. This approach allows for minimizing irreversible effects that make the interpretation of adaptation processes difficult. Some of the obtained results were consistent with expectations and confirmed previously known effects and the correctness of the established model, while some were new observations regarding the reversibility of changes in the organization of the mitochondrial network and the profile of glycolytic metabolites and the tricarboxylic acid cycle, as well as the rate of cell respiration. Of particular note is the finding that treatment of HAECs with LPS results in a significant increase in the amount of the NNMT. This completely new observation became the inspiration to undertake the research described in the second part of the dissertation. Their aim was to check whether the presence of the NNMT was related to the observed changes induced by LPS. The siRNA technique was used to silence the *NNMT* and it was shown that the response of cells with reduced levels of this enzyme to LPS was clearly attenuated. This concerned the reduction of oxidative stress, alleviation of changes in the architecture of the mitochondrial network, and the LPS-stimulated increase in the content of Opa1 and Mnf1 responsible for mitochondrial fusion, as well as the Fis1 involved

in their fragmentation. Importantly, in cells with a silenced *NNMT* gene, the normalization of the level of glycolysis and the Krebs cycle metabolites in LPS-treated cells was significantly accelerated. Moreover, silencing the *NNMT* prevented the increased activation of the store operated calcium entry (SOCE) observed in cells with unchanged expression of this gene treated with LPS and appears to promote the normalization of the autophagy process and the activation of endoplasmic reticulum stress.

It was not possible to link the changes caused by LPS with the expected and direct effects related to the reduction of protein levels and NNMT activity, such as increasing the level of SAM and reducing the amount of NAD<sup>+</sup> in cells. In the first case, the effect of LPS itself masked the expected result, and in the second, the presence of nicotinamide in the medium did not allow for a possible NAD<sup>+</sup> deficit. Therefore, elucidating the biochemical mechanism linking NNMT activity with the effects of LPS in HAEC cells requires further research. Nevertheless, this dissertation collects a number of new observations which, apart from the cognitive aspect, can provide the basis for application research.