

# **Volné radikály v buněčných (fyziologických) regulacích**

**Lukáš Kubala**

Volné radikály jsou zahrnovány mezi signální molekuly podílející se na řízení buněčných regulací.

- Regulovaná (nízká) produkce volných radikálů indukující specifické změny buněčných struktur (např. postranslační modifikace proteinů, vznik specifických lipidových peroxidů) které se uplatňují v intracelulárním signálování.
- Produkce volných radikálů v buňce nad určitou úroveň vede k poškození buněčných struktur (nespecifické) v takové míře, že buňka nepřežije

Volné radikály jsou zahrnovány většinou v signálních drahách stimulující buňky k odpovědi na stresující faktory (včetně zvýšeného množství volných radikálů v okolí, záření, ...), ale také v signálních drahách indukovaných růstovými faktory nebo vybranými mediátory zánětu.

## **Expozice k oxidativnímu stresu**

Indukce signálních drah vedoucích k zvýšení aktivity antioxidačních obranných mechanismů.

To chrání organismus proti původci stresu a dále proti příštímu i třeba silnějšimu oxidativnímu stresu (preconditioning).

Obdobnou reakci vyvolávají také toxické látky xenobiotika, pesticidy, herbicidy, fungicidy, ozón, cigaretový kouř, nebo záření. To je spojeno s mechanismem jejich působení – indukce intra- nebo extra-celulární tvorby ROS.

# Bakteriální redoxní regulace

Baktérie vystavení zvýšenému oxidativnímu stresu, který však nepřesáhne letální úroveň, zvyšuje syntézu desítek ochranných proteinů – indukce resistance bakterií.

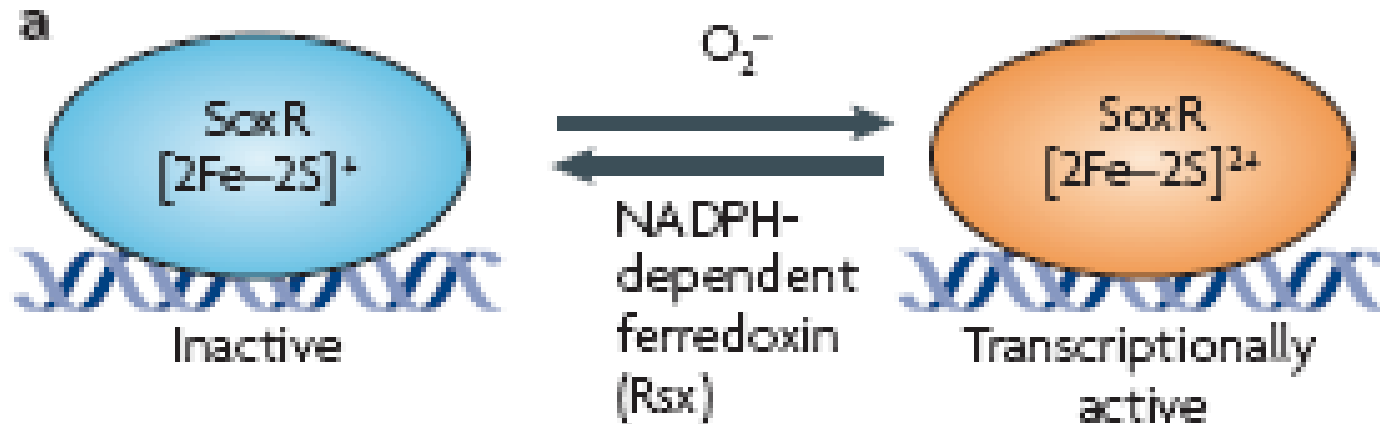
Intracelulární mechanismy bakterií rozlišují typ oxidantů - geny indukované po ovlivnění superoxidem se liší od genů indukovaných  $H_2O_2$ .

2 rodiny redox dependentních transkripčních faktorů

Proteiny SoxR a SoxS řídí odpověď na superoxid  
Protein OxyR řídí odpověď na peroxid vodíku

# Regulace Sox transkripčních faktorů

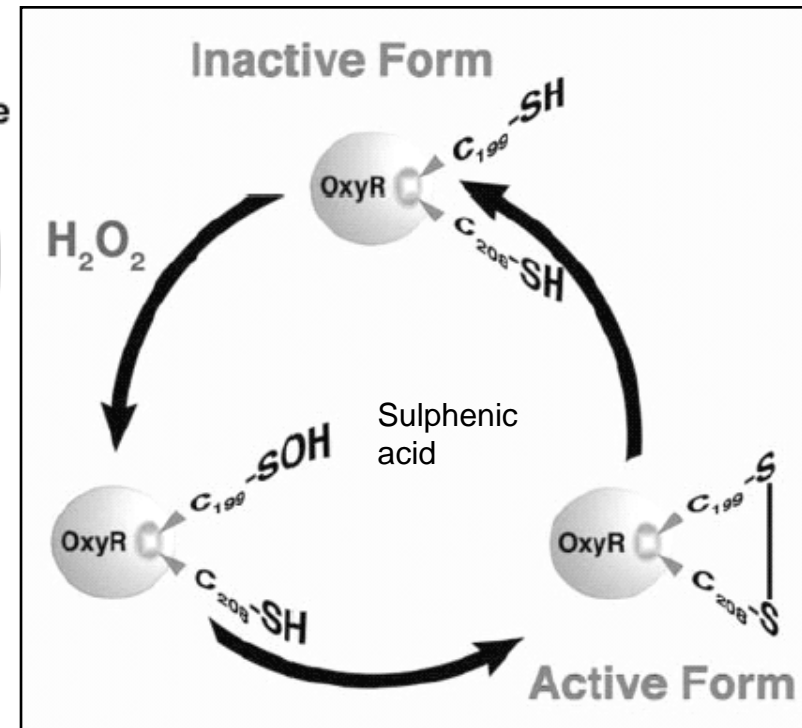
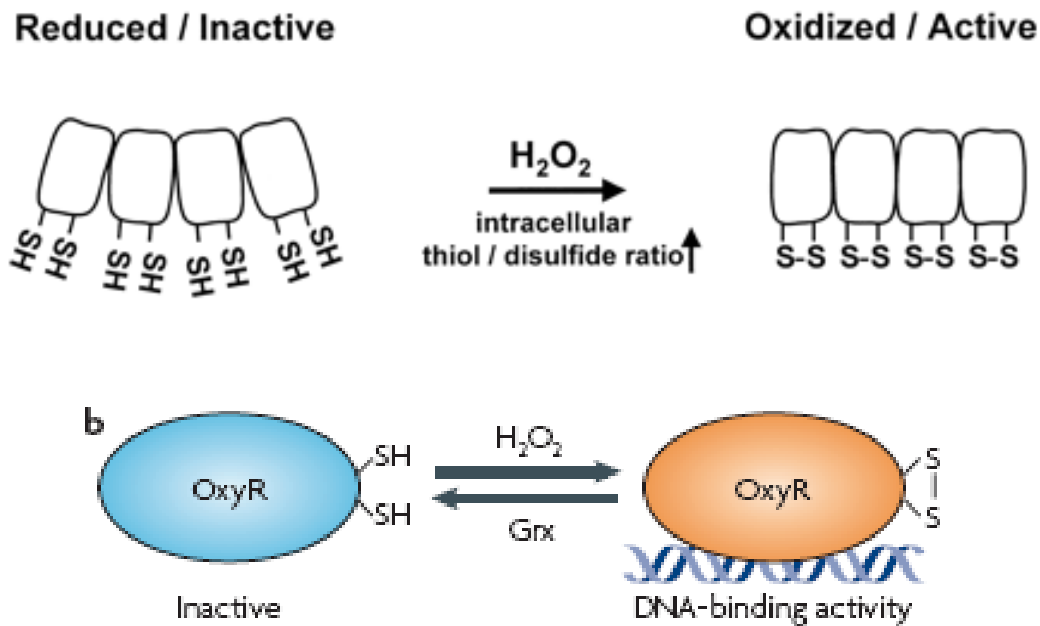
Superoxid aktivuje senzitivní centrum SoxR kterým je klastr železa-síry (2Fe-2S) zabudované v proteinové struktuře. Dochází k oxidaci  $[2\text{Fe}-2\text{S}]^+$  na  $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$ . To umožní vazbu SoxR na DNA a indukuje expresi několika genů včetně SoxS. SoxS indukuje transkripci dalších genů (např. pro MnSOD, DNA reparační enzymy ...).



# Regulace OxyR transkripčního faktoru – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Transkripční faktor OxyR má několik cysteinů, které jsou umístěny v regulační části proteinu. Oxidace SH skupin těchto cysteinů vede k formaci cysteinových můstků a aktivaci transkripčního faktoru. Navázáním na promotor dochází k indukci transkripce 9 proteinů včetně OxyS (reparace DNA), katG (peroxidáza) a gorZ (glutathion reduktáza).

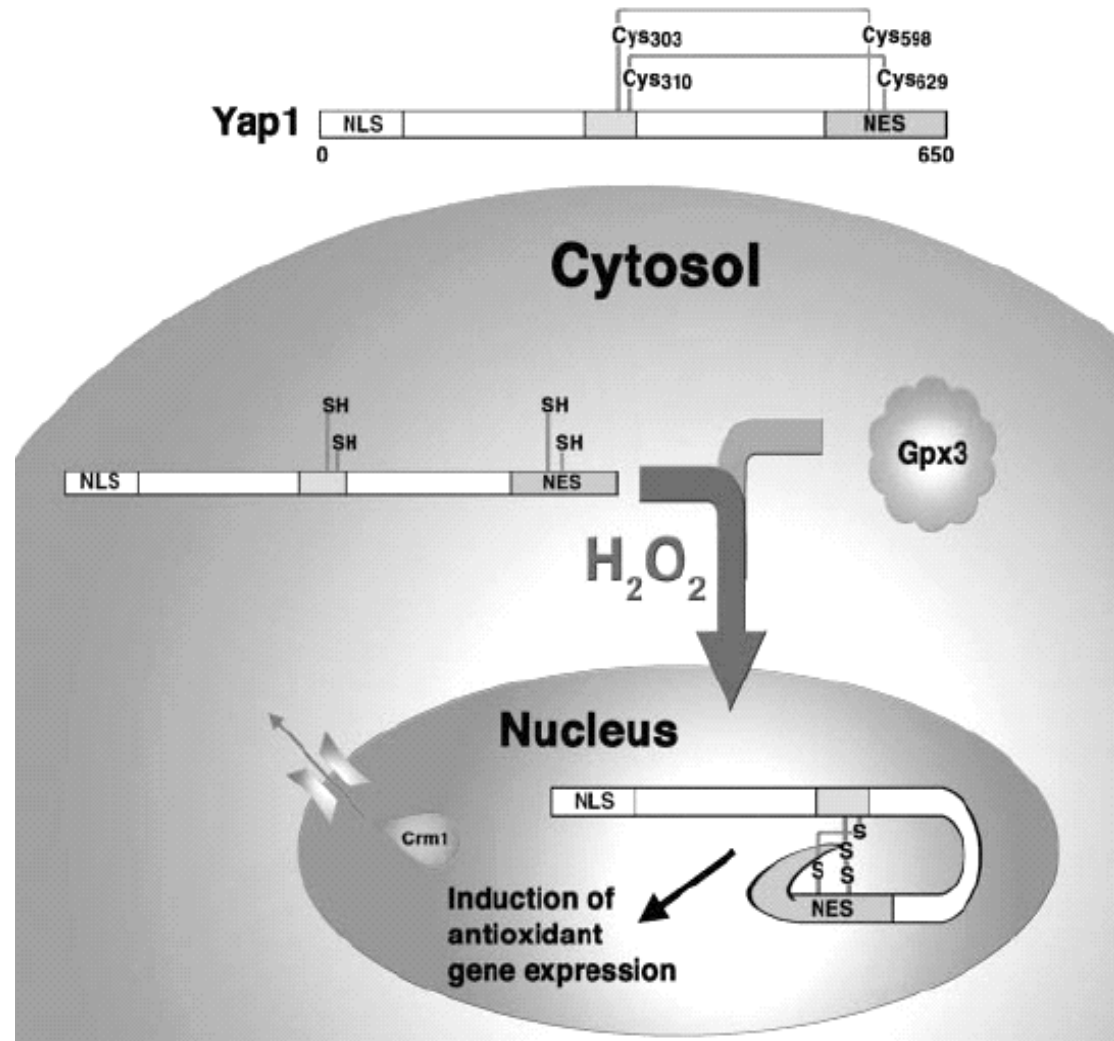
## Schematic Model of OxyR activation



Liu 2005 Circ. Res.

# Redoxní regulace u kvasinek

Homologem OxyR u kvasinek *Sacharomices sp.* je Yap1. Mutace v genu pro Yap1 nebo jeho delece způsobuje nepřítomnost antioxidantních enzymů. Regulace aktivity je dána formací disulfidových můstků v přítomnosti enzymu Gpx3 příbuznému glutathion peroxidázám.





# Odpověď u vyšších organismů na změny redoxního prostředí v buňce

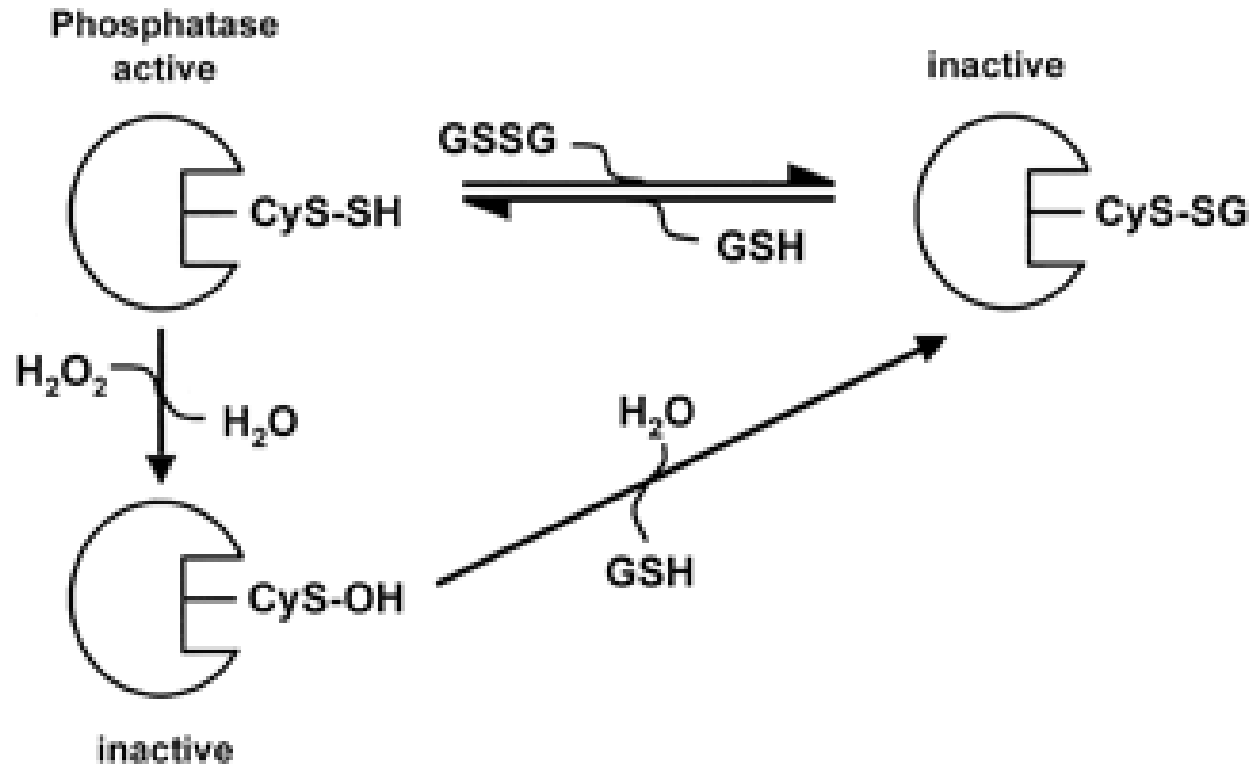
Expozice ROS a/nebo změny v intracelulárním thiolovém redoxním stavu indukují

- změny v signalizačních kaskádách protein kináz, následně transkripčních faktorů vedoucích k modifikacím transkripce genů
- přímou změnu aktivity transkripčních faktorů vedoucích k modifikacím transkripce genů

# Posttranslational modification/Oxidative damage to proteins

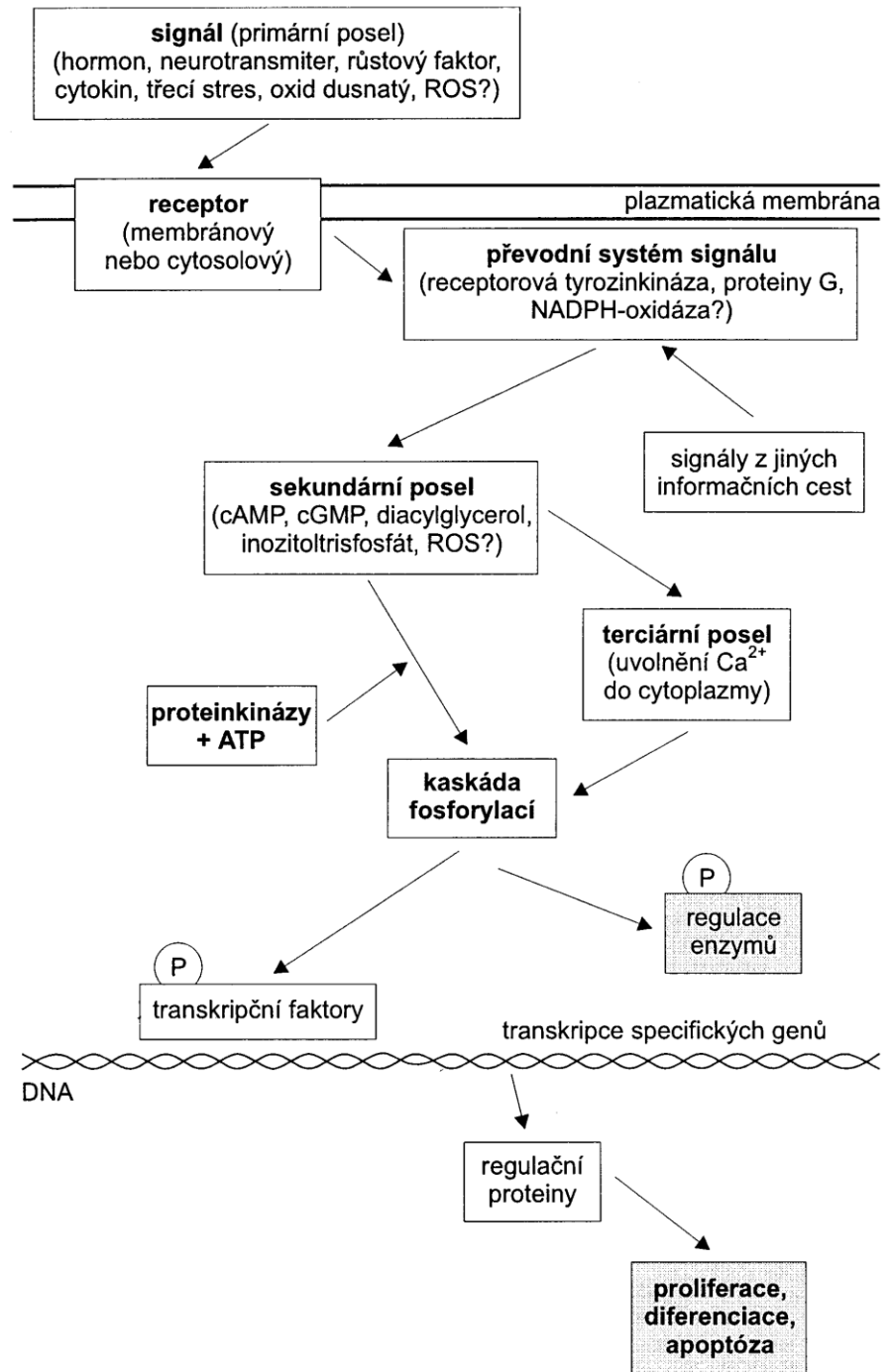
- Site-specific amino acid modifications (specific amino acids differ in their susceptibility to ROS attack)
- Fragmentation of the peptide chain
- Aggregation of cross-linked reaction products
- Altered electrical charge
- Increased susceptibility to proteolysis
- Oxidation of Fe-S centers by  $O_2^{\bullet-}$  destroys enzymatic function
- Oxidation of specific amino acids “marks” proteins for degradation by specific proteases
- Oxidation of specific amino acids (e.g., Tyr, Cys) leads to cross-linking

# Alternative pathways of protein tyrosine phosphatase inhibition by ROS or by changes in the thiol/disulfide redox state



A cysteine residue in the catalytic site of the phosphatase is critical for its catalytic activity. Inactivation can occur either by reaction with hydrogen peroxide to form a sulfenic acid derivative or by reaction with glutathione disulfide, resulting in glutathiolation of the critical cysteine residue. Reactivation may occur by reaction with reduced glutathione or other thiol compounds.

# Základní principy intracelulárního přenosu signálu se zahrnutím ROS



# Two Classical Transcription Factors are Associated with Exposure to Oxidants:

- MAPK/AP-1 (Activator Protein-1)



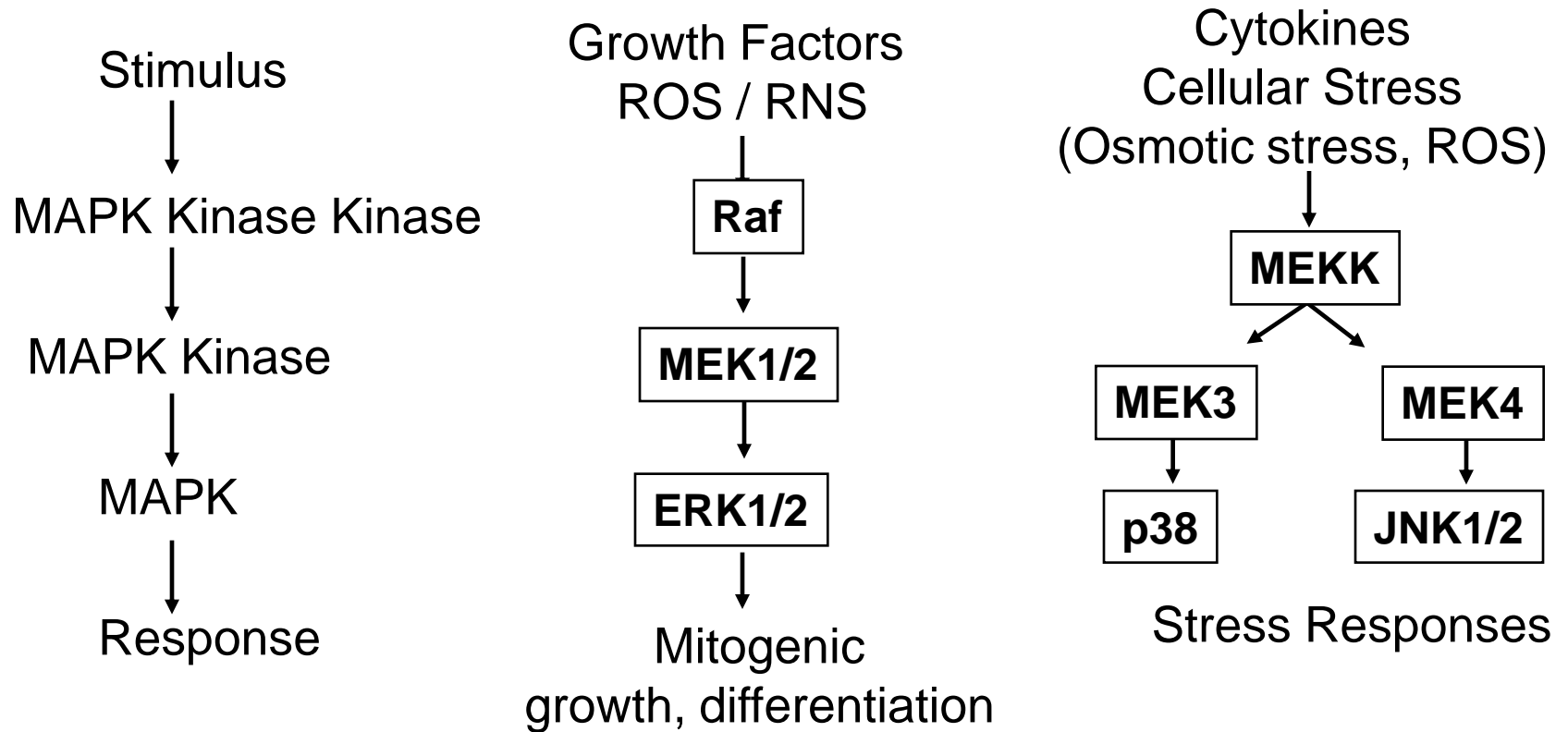
Proliferation  
Survival  
Apoptosis/Death

- NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor –  $\kappa$ B)



Inflammation  
Survival  
Cell Cycle Control

# General Schema for Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Cascade



ERK=Extracellular Signal-Regulated Kinase  
JNK=c-Jun N-terminal Kinase

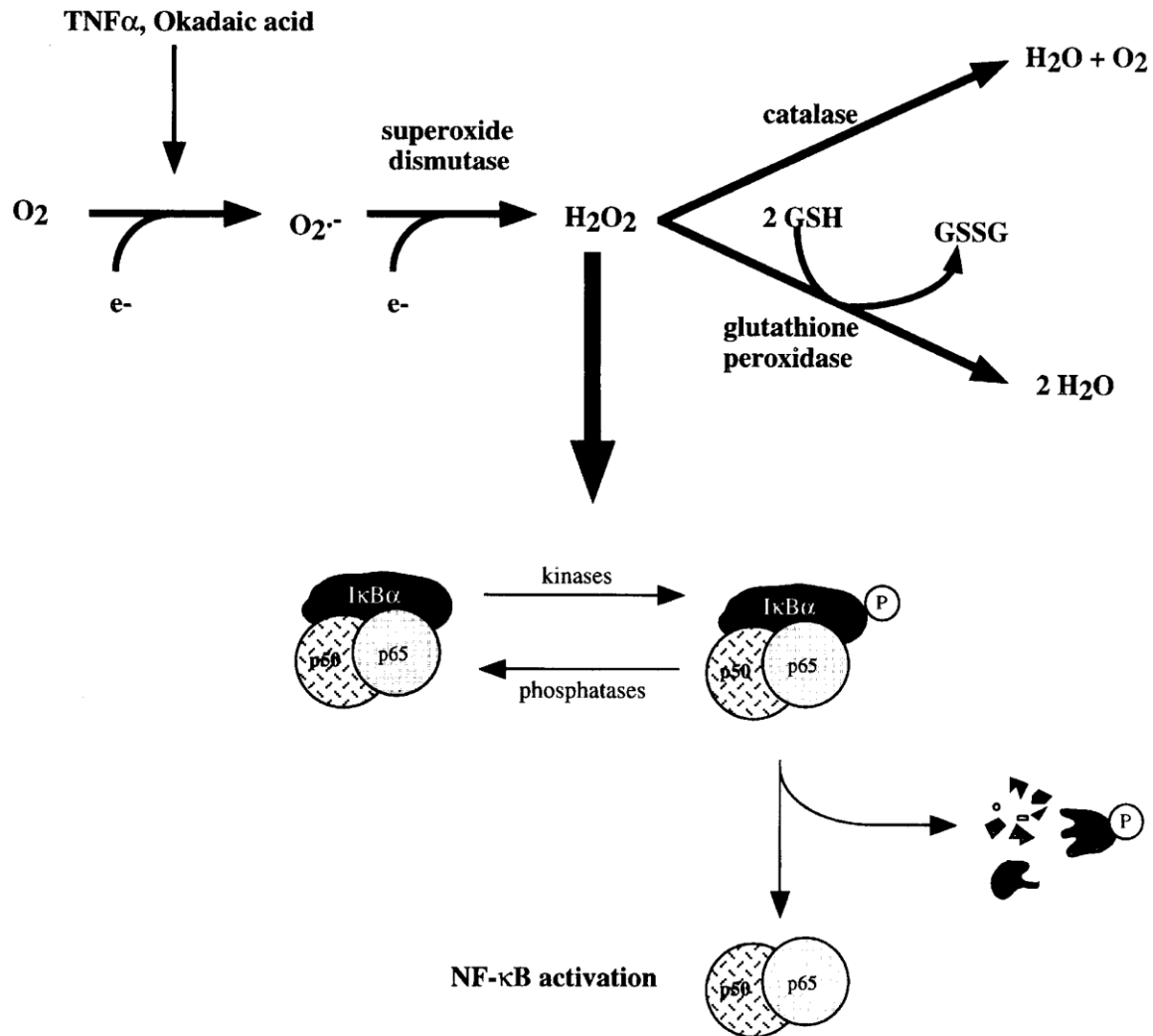
## Transkripční faktor NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B (heterodimer p50 a p65) je komplex proteinů které aktivují transkripci mnoha genů jako odpověď na různé stimuly.

V neaktivní formě je vázaný na inhibiční podjednotku I $\kappa$ B. Fosforylace vede k aktivaci, disociaci a degradaci I $\kappa$ B.

Aktivovaný NF- $\kappa$ B se přesune do jádra, váže se na DNA a aktivuje expresi několika genů (iNOS, proteiny akutní fáze, růstové faktory, adhezivní molekuly atd.).

# Model aktivace transkripční faktor NF- $\kappa$ B peroxidem vodíku





# Transkripční faktor AP-1 (activator protein 1)

AP-1 je dimer, produkt genů jun a fos.

U neovlivněných buněk je pouze malé množství inaktivního AP-1 v cytoplasmě a to ve formě homodimer dvou c-Jun.

Stresové faktory včetně záření, peroxid vodíku, prozánětlivých cytokinů a také antioxodiantů indukují syntézu AP-1.

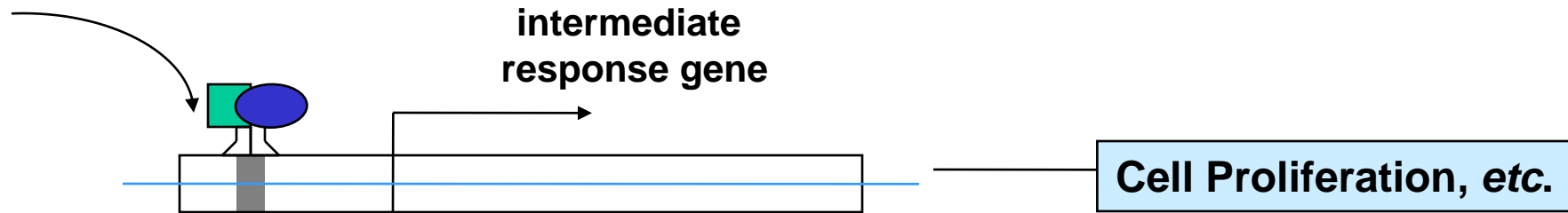
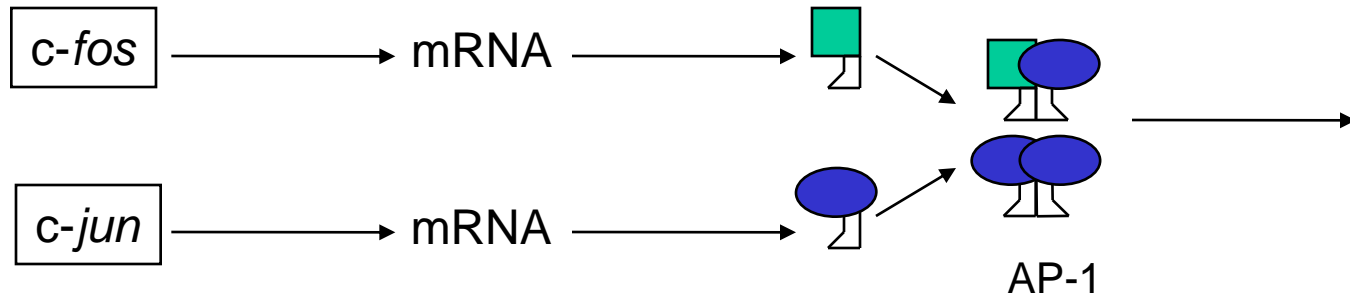
Nově syntetizovaný AP-1 nemusí ještě být aktivní. Vazebná kapacita AP-1 na DNA je regulována redoxním mechanismem zahrnujícím cysteinová rezidua na DNA-binding doméně Fos a Jun (přímá kontrola aktivity transkripčního faktoru). Oxidace má za následek pokles vazebné kapacity. Oxidace je revertována přímo intracelulárními thioly nebo buněčným redox/DNA-reparačním enzymem Ref-1 (redox factor 1).

# Formation of Activator Protein-1 (AP-1)

Stress, growth factors, cytokines, oxidants

MAPK

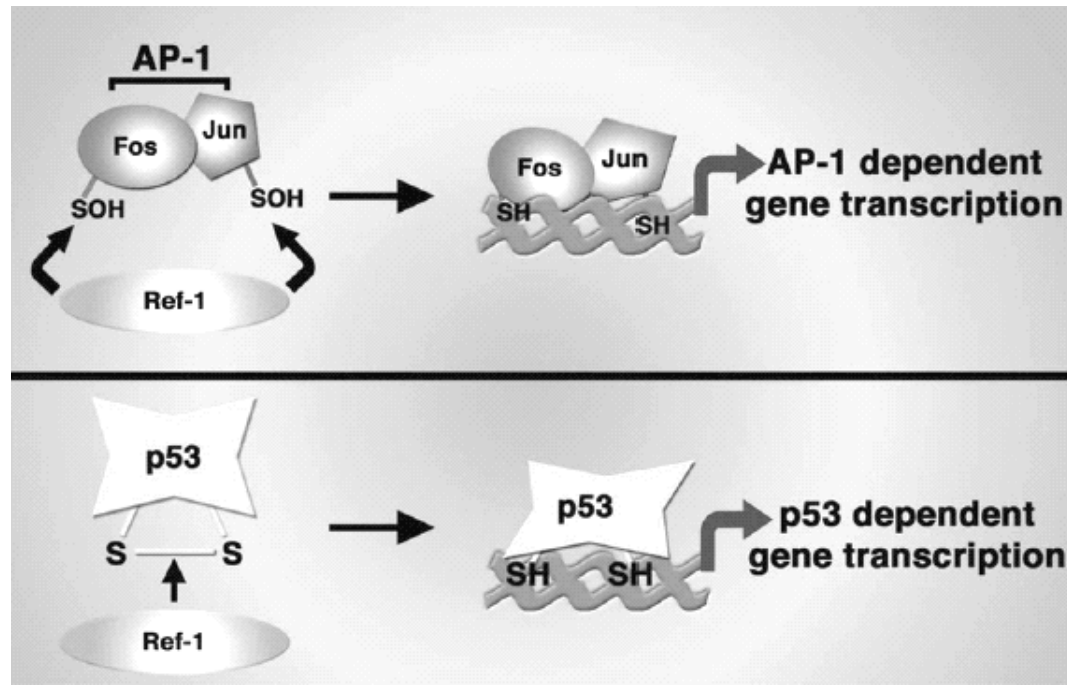
early response genes



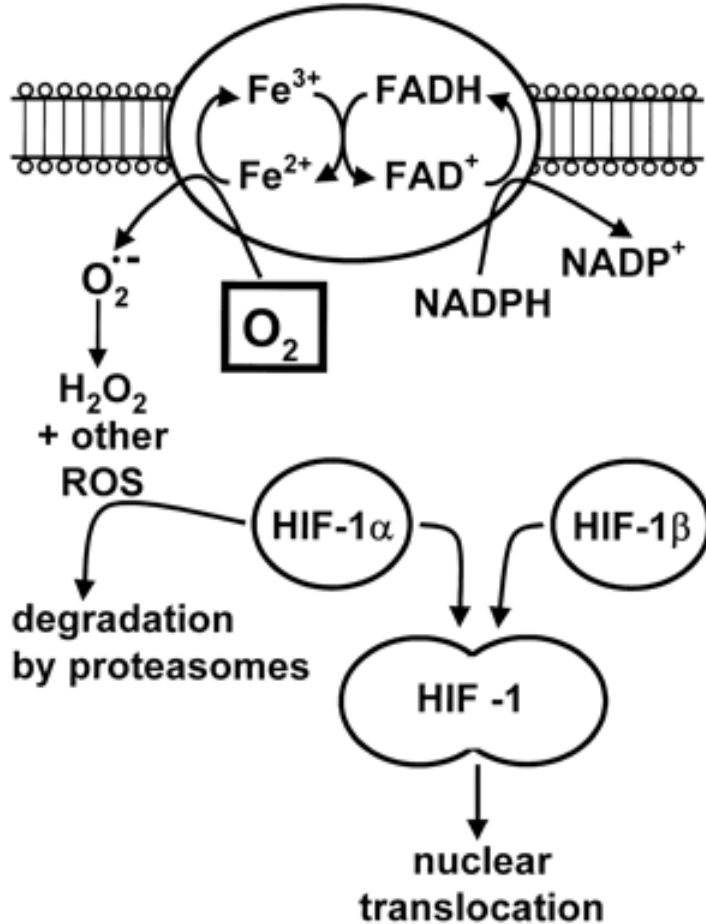
## Přímá modulace aktivity transkripčních faktorů přes bifunkční enzym **Redox faktor-1 (Ref-1)**.

Na C-terminálním konci konservovaná doména s DNA-reparační aktivitou. Účastní se opravy apyrimidinových-apurinových nukleotidů (modifikace vznikající po expozici k ionizujícímu nebo UV záření a ROS).

Na N-terminálním konci Ref-1 je redoxní regulační doména obsahující cysteiny jejichž modifikace umožňuje regulaci transkripčních faktorů (AP-1, NF-kapaB, p53, HIF-1 a HIF podobné faktory). To je dáno tím, že oxidované formy těchto transkripčních faktorů mají omezenou vazbu na DNA a Ref-1 je klíčový pro jejich specifickou redukci.



# Regulation of the transcription factor HIF-1



Regulation of the transcription factor hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). HIF-1 is a heterodimeric protein composed of the subunits HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$ , the genes of which are both constitutively expressed. Changes in oxygen tension fail to affect the concentration of HIF-1 $\beta$ , whereas HIF-1 $\alpha$  is rapidly degraded under normoxic conditions by proteasomes in a ROS-dependent fashion. In these cells, ROS production is tightly linked to oxygen concentrations and, therefore, serves as a sensor for oxygen tension.

HIF-1 kontroluje gen pro erythropoietin.

Hypoxie tudíž indukuje HIF-1 a tvorbu erythropoietinu.

# The Nrf2–Keap1 System

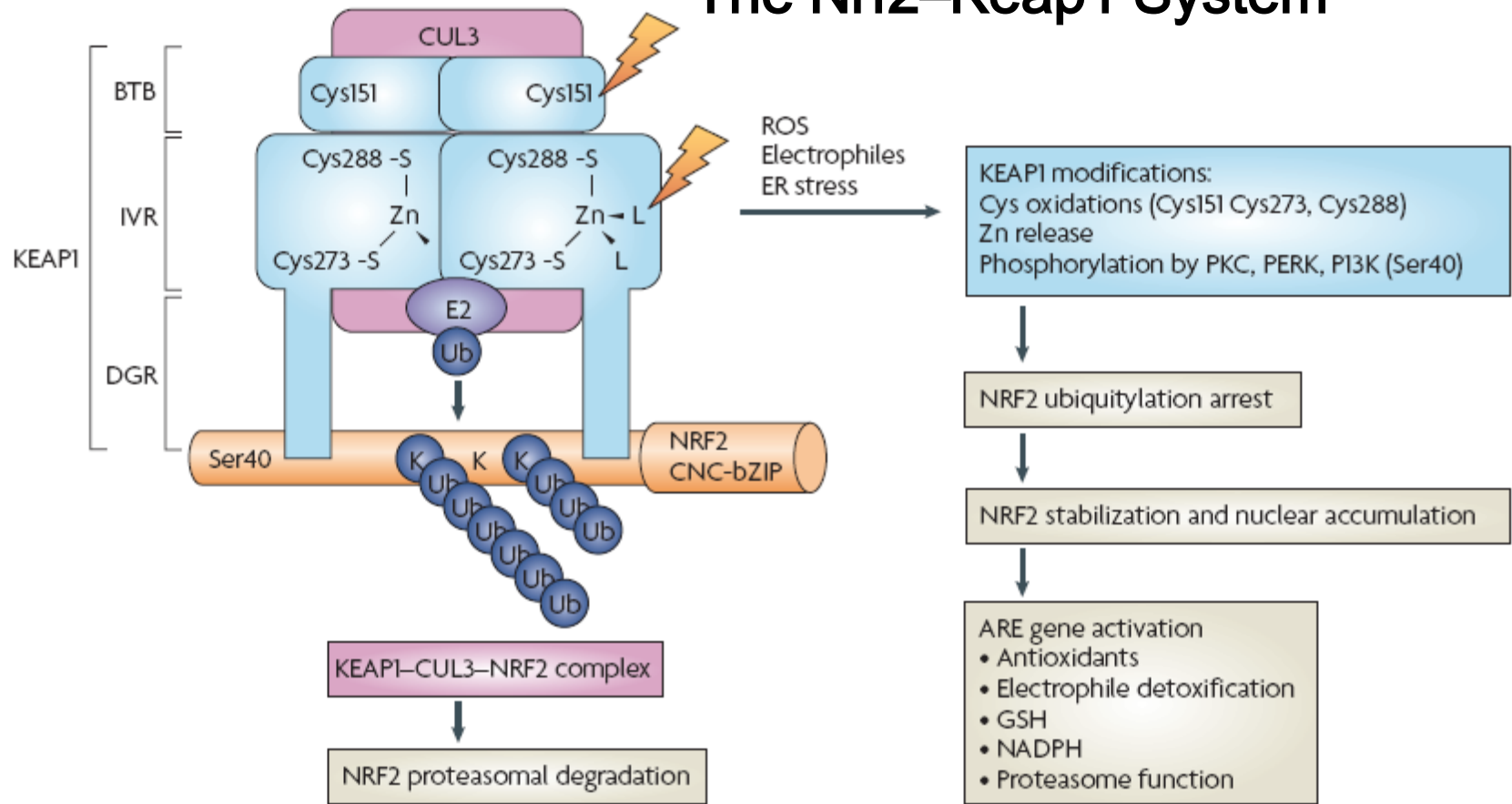
## **Coordinates cellular response to oxidants or xenobiotic stress**

(Induction of a host of detoxifying enzymes known collectively as phase I and II enzymes - NAD(P)H quinone oxidoreductase, glutathione S-transferase, cysteine– glutamate exchange transporter, and the multidrug resistance–associated protein)

Cis-acting elements in the regulatory regions of these and other coordinately induced genes is a motif termed the **antioxidant responsive element (ARE)**.

**Transcriptional regulator Nrf2** as the factor that binds to this element. Nrf2 is also a bZIP transcription factor that binds DNA as a heterodimer in conjunction with members of the Maf family.

# The Nrf2–Keap1 System



**Schematic of the speculative two-site interaction model of KEAP1–NRF2.** The dimeric Kelch-like ECH-associated protein-1 (KEAP1) receptor contacts one NRF2 (nuclear factor (erythroid-derived-2)-like-2) molecule at two distinct N-terminal sites 103, 131. The KEAP1–cullin-3 (CUL3) complex constantly targets NRF2 for proteasomal degradation through ubiquitylation of NRF2 Lys residues that are located at its N terminus, between the two KEAP1 interaction sites.

Electrophiles and signals from reactive oxygen species (ROS) modify KEAP1 Cys residues, leading to zinc release and a conformation that is non-permissible for ubiquitylation. An alternative speculative model proposes that two NRF2 molecules are each contacted by the Kelch domain of dimeric KEAP1 (Ref. 104). Phosphorylation of Ser40 by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase RNA (PKR)-like endoplasmic reticulum (ER) kinase (PERK) or protein kinase C (PKC) might also lead to ubiquitylation arrest. KEAP1 dimerizes through the broad complex–tramtrack–bric-a-brac (BTB) domain and interacts with NRF2 through the Kelch domain. The KEAP1 intervening region (IVR) that carries reactive Cys residues is located between the BTB and Kelch domains. ARE, antioxidant response element; CNC-bZIP, cap ‘n’ collar-basic leucine zipper; DGR, double glycine repeat; GSH, glutathione.

## Trx (thioredoxin) oxidoreduktasa

Trx je jedním z proteinů inducibilně exprimovaných v lymfocytech po působení oxidantů

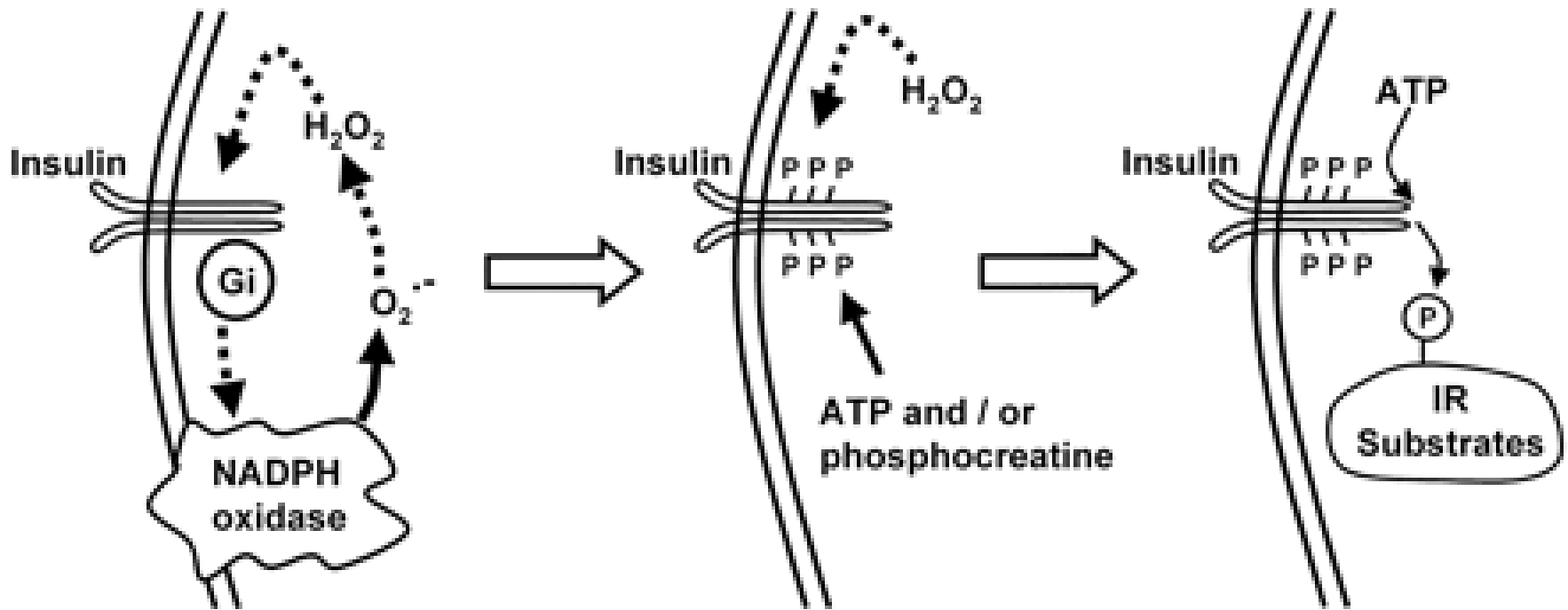
Trx + glutathionový systém hrají klíčovou úlohu v udržování redukujícího intracelulárního redoxního stavu.

Trx gen má sekvence, které obsahují vazebná místa pro AP-1 a NF-kappaB

Expozice Mf oxidativnímu stresu indukuje expresi Trx peroxidasy (peroxyredoxinu), Hem oxygenasy 1 (HO-1) a cystinového transportéru  $x_C^-$  Trx (thioredoxin) oxidoreduktasa

Protože plasmatická koncentrace redukovaného cysteinu je nízká, cystinový transportér má klíčovou roli v zásobování cysteinem a v biosyntéze glutathionu v Mf a lymfocytech

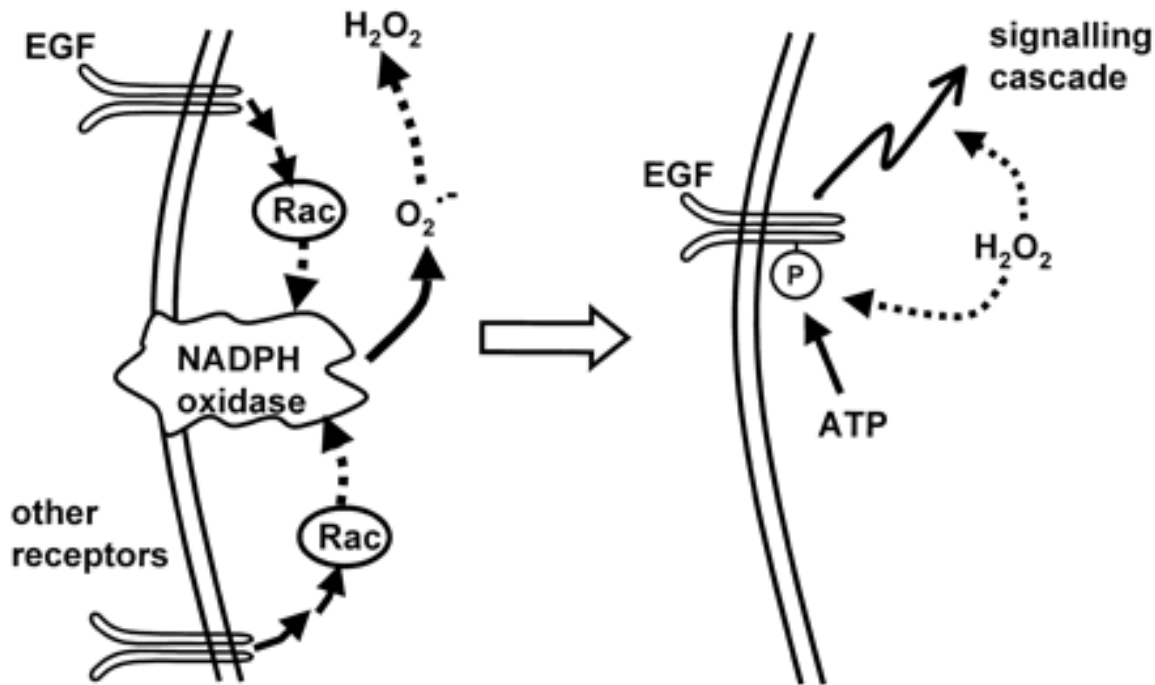
# Role of ROS in insulin receptor kinase activation



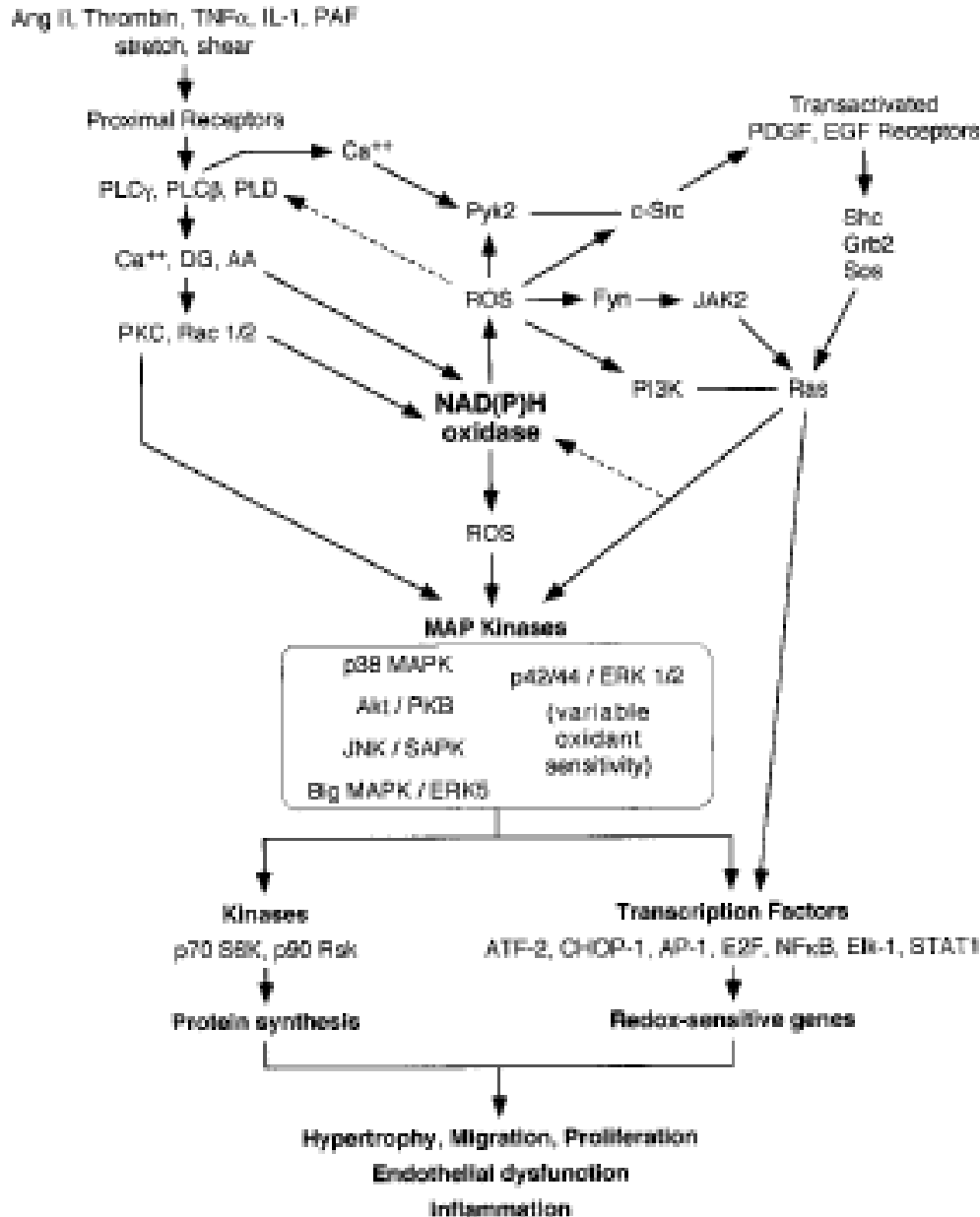
Interaction of the insulin receptor with its ligand causes the activation of NAD(P)H oxidase and the production of superoxide and hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide, in turn, is involved in the autophosphorylation and activation of the insulin receptor kinase.



# Role of ROS in EGF receptor-mediated signalling



The interaction of the EGF receptor or other related membrane receptors with corresponding ligands leads to activation of NAD(P)H oxidase and the production of superoxide and hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide, in turn, facilitates the autophosphorylation of the membrane receptor and the induction of the signal cascade. The activation of NAD(P)H oxidase by other membrane receptors such as the angiotensin II receptor can provide a cooperative effect that contributes to the autophosphorylation of the EGF receptor and to the activation of the EGF-dependent signaling cascade.



## Redox-sensitive signaling pathways in vascular cells.

G protein-coupled receptor agonists, mechanical forces, and growth factors activate both redox-sensitive and redox-insensitive signaling pathways.

1- G protein-coupled receptor is activated, phospholipases produce soluble and lipid second messengers that lead to activation of the NAD(P)H oxidase.

2- Superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modify the activity of tyrosine kinases such as c-Src, Fyn, and the EGF receptor kinase, as well as serine/threonine kinases including p38MAPK, JNK, big MAPK, and Akt.

3- Redox-sensitive and -insensitive pathways converge to stimulate downstream growth-related enzymes such as p70S6K and p90RSK and to activate transcription factors leading to expression of redox-sensitive genes.

**TABLE 2. Redox Sensitivity of Gene Expression in Cardiovascular Cells**

Gene	Cell Type	Stimulus	Reference
VCAM-1	Endothelial cells	TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4	116, 117
ICAM-1	Endothelial cells	TNF- $\alpha$ , NO, lactosylceramide	26, 71, 73, 116
E-selectin	Endothelial cells	IL-1 $\alpha$ , LPS, PMA, TNF- $\alpha$	73, 117, 118
MCP-1	Mesangial cells	TNF- $\alpha$	24, 72, 106, 119
	VSMCs	PDGF	
	VSMCs	Ang II	
	VSMCs	TNF- $\alpha$	
MCSF	Endothelial cells	TNF- $\alpha$ , ox-LDL	75, 76, 119
	Endothelial cells	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$	
	Mesangial cells	TNF- $\alpha$	
eNOS	Endothelial cells	Xanthine/xanthine oxidase	120
iNOS	Mesangial cells	IL-1 $\beta$	121
Cu/Zn-SOD	Endothelial cells	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	70
Catalase	Endothelial cells	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	70
Glutathione peroxidase	Endothelial cells	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	70
Mn-SOD	Endothelial cells	Thioredoxin	122
HO-1	Endothelial cells	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , shear stress	30, 123, 124
	Macrophages	Ox-LDL	
	VSMCs	PDTC	
COX-2	Mesangial cells	IL-1 $\beta$	89, 121
	VSMCs	Catalase overexpression	
HSP-70	Endothelial cells	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	70, 125
		Xanthine/xanthine oxidase	
Scavenger receptor	VSMCs	PMA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /vanadate	126
	Macrophages		
IL-8	Microvascular endothelial cells	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	127
HB-EGF	Endothelial cells	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	128, 129
	VSMCs	Methylglyoxal	
Atrial natriuretic factor	Cardiac myocytes	Ouabain	130
VEGF	Endothelial cells	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	131, 132
	VSMCs	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 4-hydroxynonenal	

e/i NOS indicates endothelial/inducible nitric oxide synthase; HO-1, heme oxygenase-1; COX-2, cyclooxygenase-2; HB, heparin binding; LPS, lipopolysaccharide; PMA, phorbol myristate acetate; ox, oxidized; and PDTC, pyrrolidine dithiocarbamate.

