

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 působí často na signální drahy 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**.

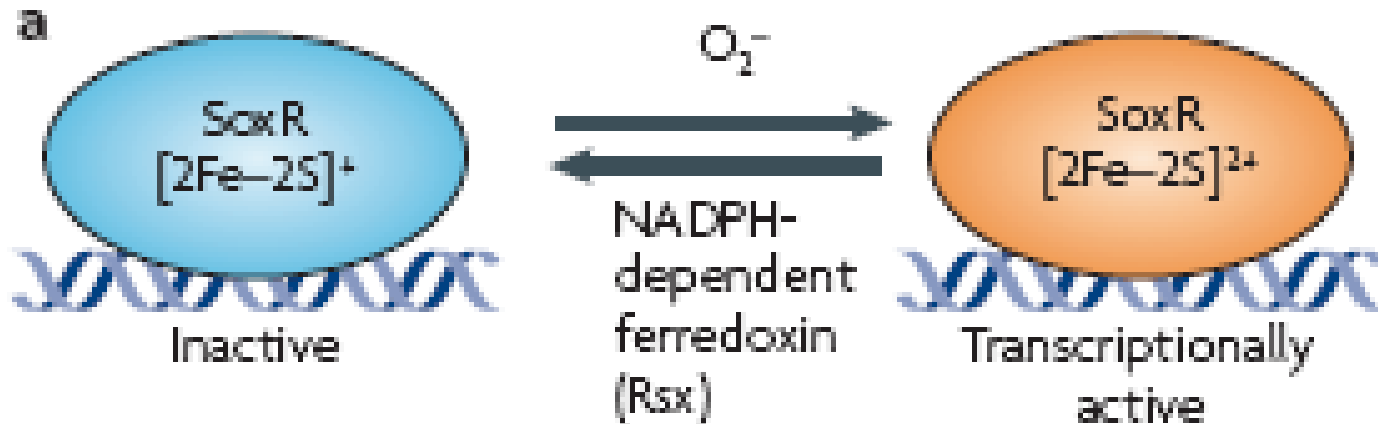
Intracelulární mechanismy bakterií **rozlišují typ oxidantů** - geny indukované po ovlivnění superoxidem se liší od genů indukovaných H_2O_2 .

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) zabudovaný 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 ...).

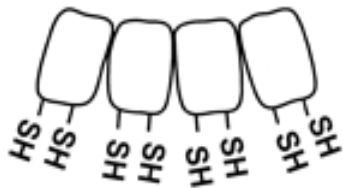


Regulace transkripčního faktoru OxyR – H₂O₂

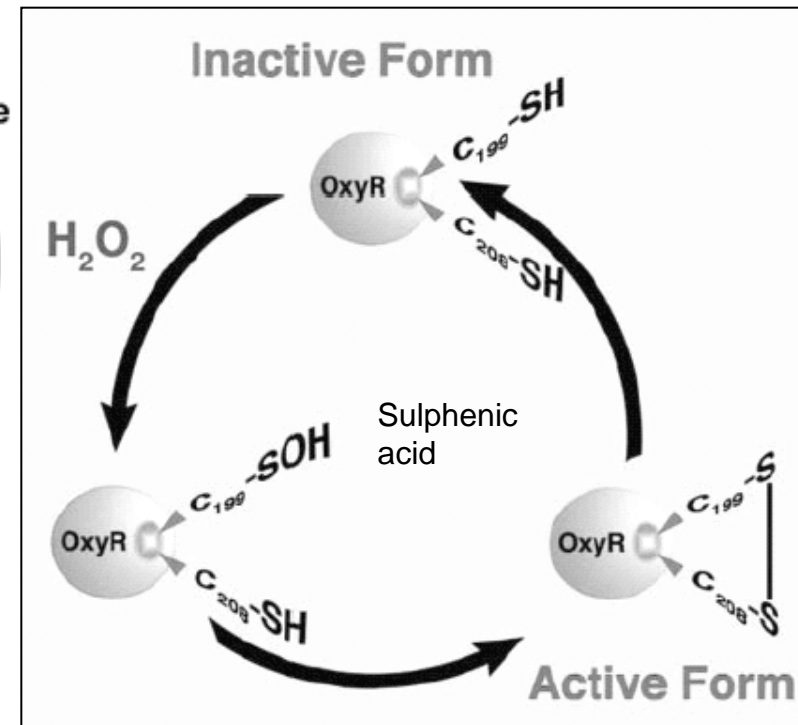
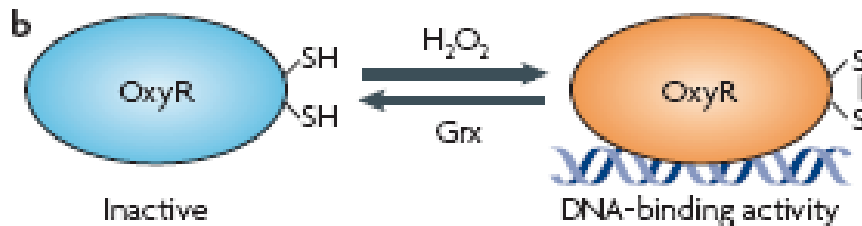
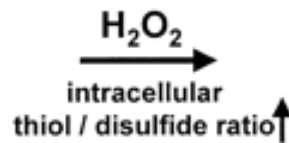
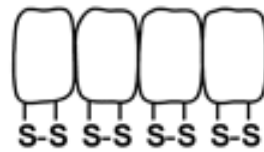
Transkripční faktor OxyR má několik cysteinů, které jsou umístěny v regulační části proteinu. Oxidace SH skupin těchto cysteinů vede k formaci cysteinových můstků a aktivaci transkripčního faktoru. Navázáním na promotor dochází k indukci transkripce 9 proteinů včetně OxyS (reparace DNA), katG (peroxidáza)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

Schematic Model of OxyR activation

Reduced / Inactive



Oxidized / Active

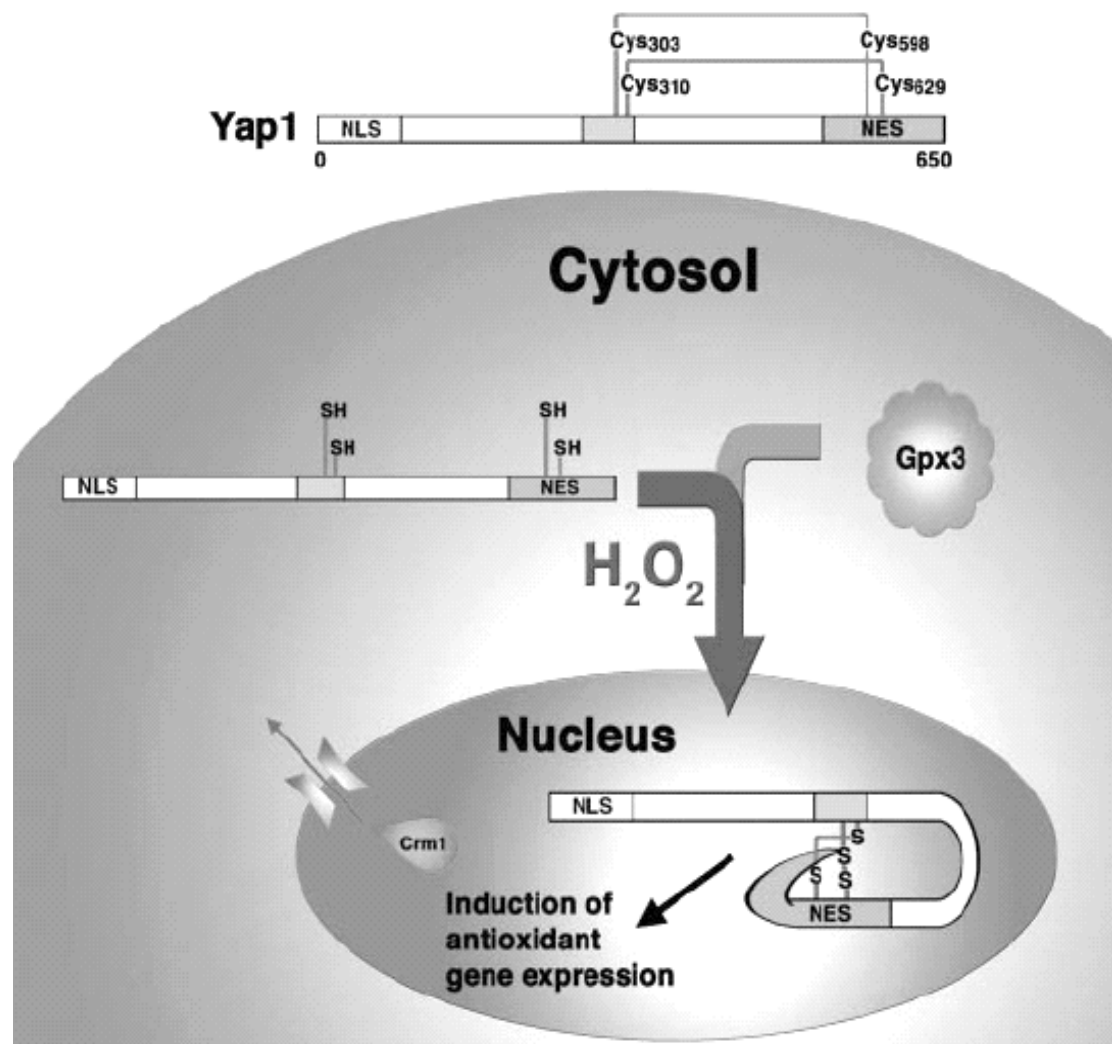


Redoxní regulace u kvasinek

Homologem OxyR u kvasinek *Sacharomices sp.* je Yap1.

Regulace aktivity je dána formací disulfidových můstků v přítomnosti enzymu Gpx3 příbuznému glutathion peroxidázám.

Mutace v genu pro Yap1 nebo jeho delece způsobuje nepřítomnost antioxidantních enzymů.



Odpověď u vyšších organismů na změny redoxního prostředí v buňce

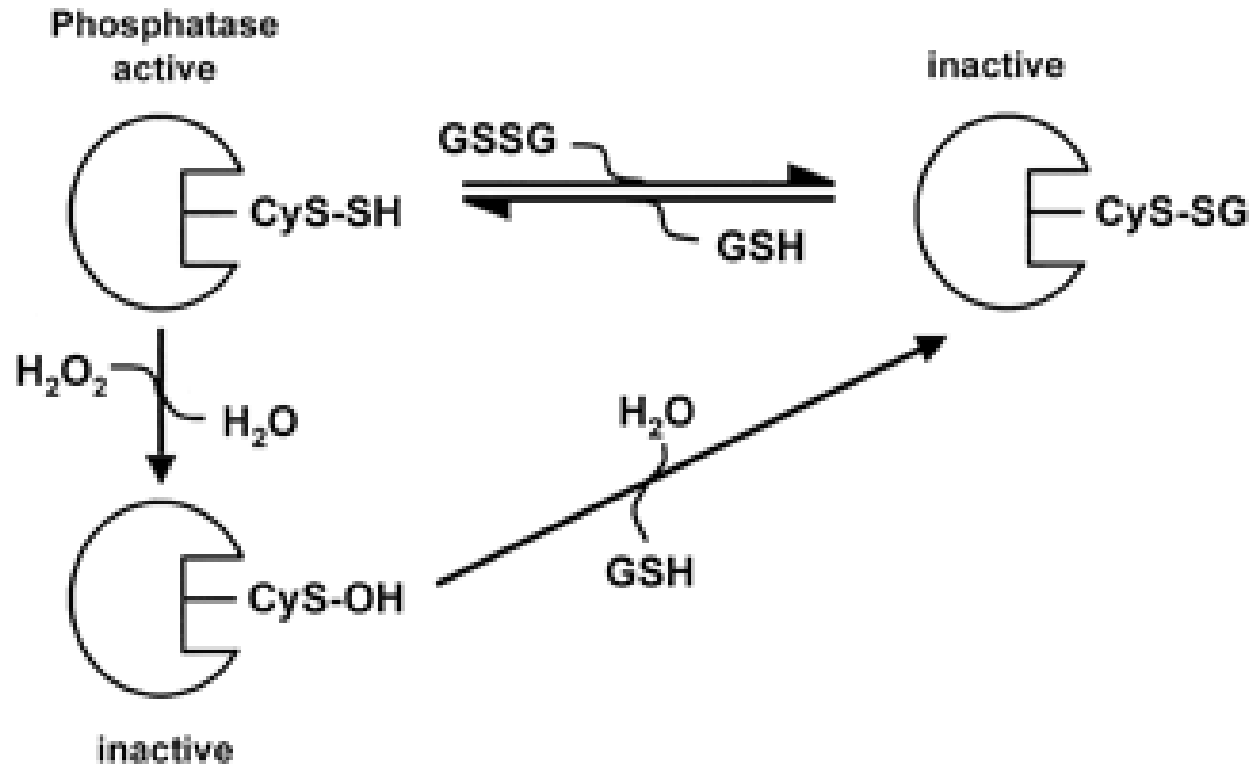
Expozice ROS a/nebo změny v intracelulárním redoxním stavu indukují

- 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

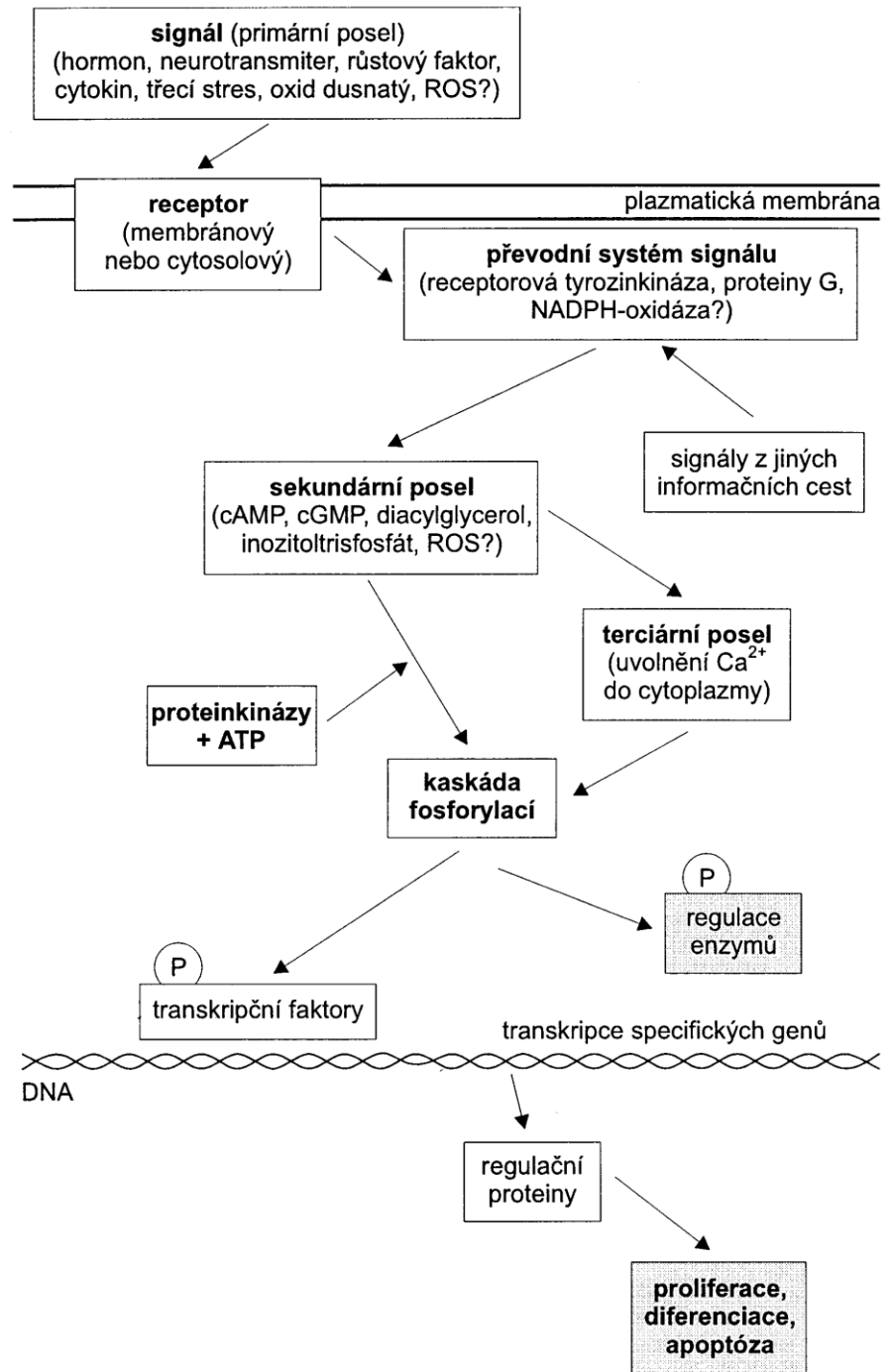
- Site-specific amino acid modifications (specific amino acids differ in their susceptibility to ROS attack)
- Fragmentation of the peptide chain
- Oxidation of specific amino acids (e.g., Tyr, Cys) leads to cross-linking
- Aggregation of cross-linked reaction products
- Altered electrical charge
- Oxidation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

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

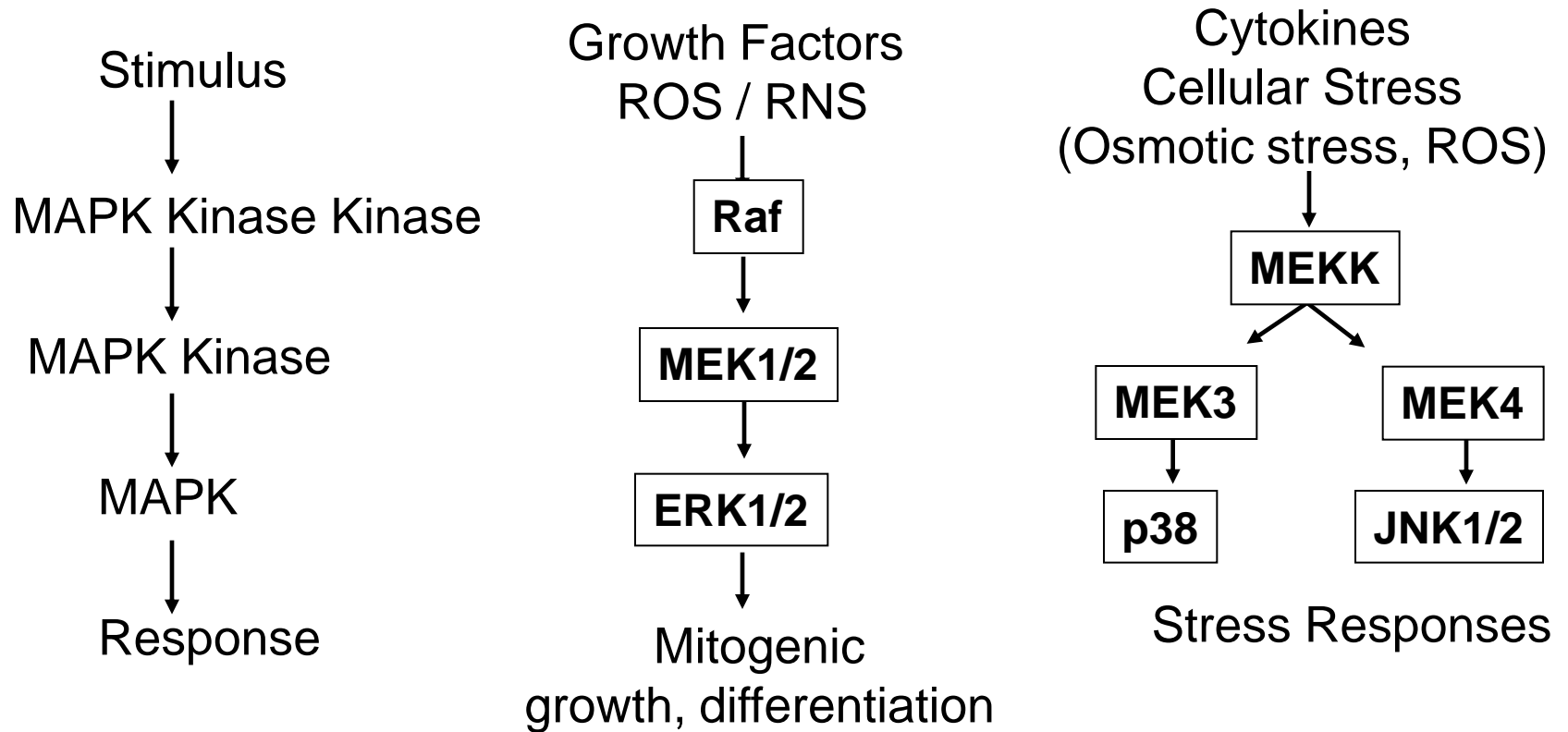


A cysteine residue in the catalytic site of the phosphatase is critical for its catalytic activity. Inactivation can occur either by reaction with hydrogen peroxide to form a sulfenic acid derivative or by reaction with glutathione disulfide, resulting in glutathiolation of the critical cysteine residue.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

Základní principy intracelulárního přenosu signálu se zahrnutím ROS



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



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

Two Classical Transcription Factors are Associated with Exposure to Oxidants:

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



Proliferation
Survival
Apoptosis/Death

- NF- κ B (Nuclear Factor – κ B)



Inflammation
Survival
Cell Cycle Control

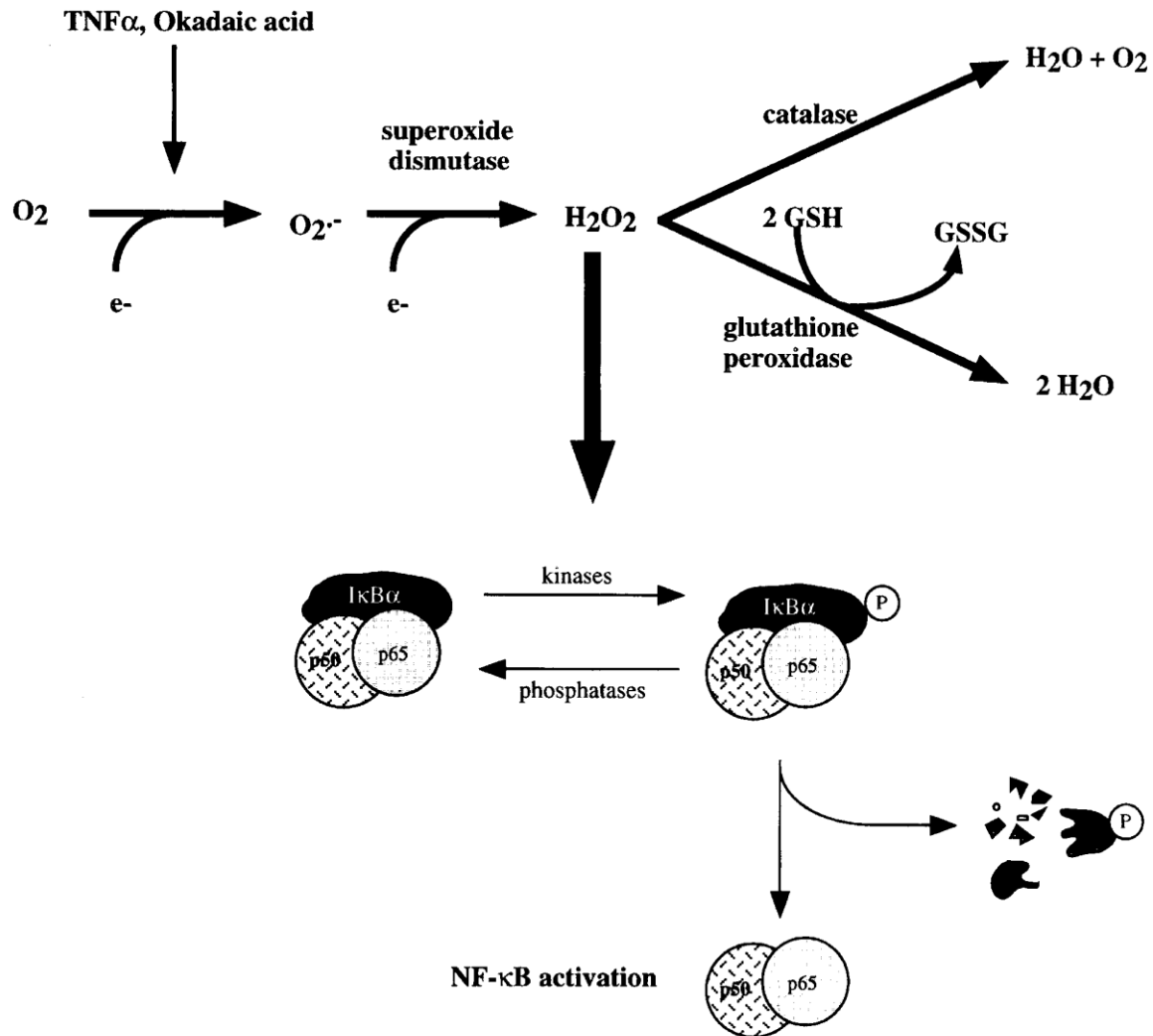
Transkripční faktor NF- κ B

NF- κ 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 κ B. Fosforylace vede k aktivaci, disociaci a degradaci I κ B.

Aktivovaný NF- κ 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- κ 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.

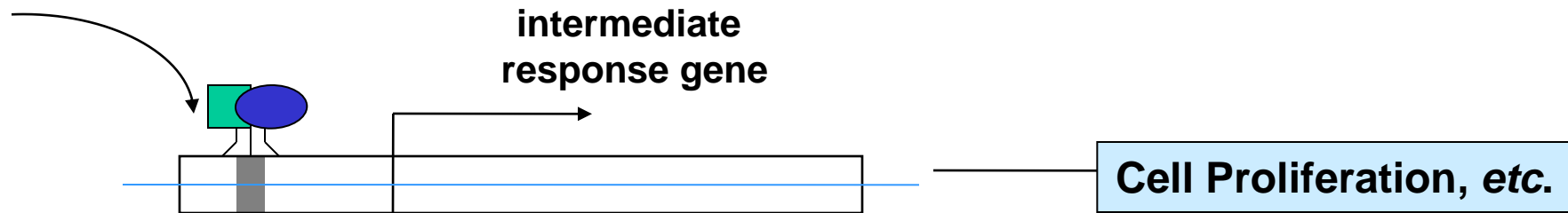
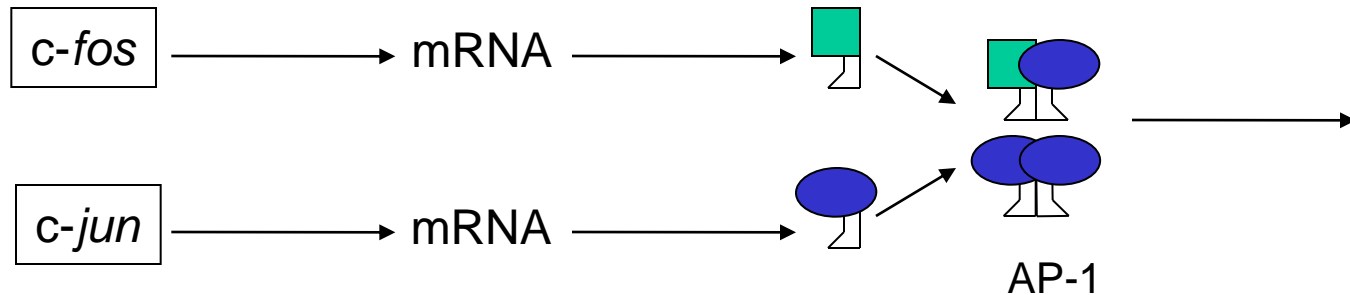
Nově syntetizovaný AP-1 nemusí ještě být aktivní. Vazebná kapacita AP-1 na DNA je regulována redoxním mechanismem zahrnujícím cysteinová rezidua na DNA-binding doméně Fos a Jun (přímá kontrola aktivity transkripčního faktoru). Oxidace má za následek pokles vazebné kapacity. Oxidace je revertována přímo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

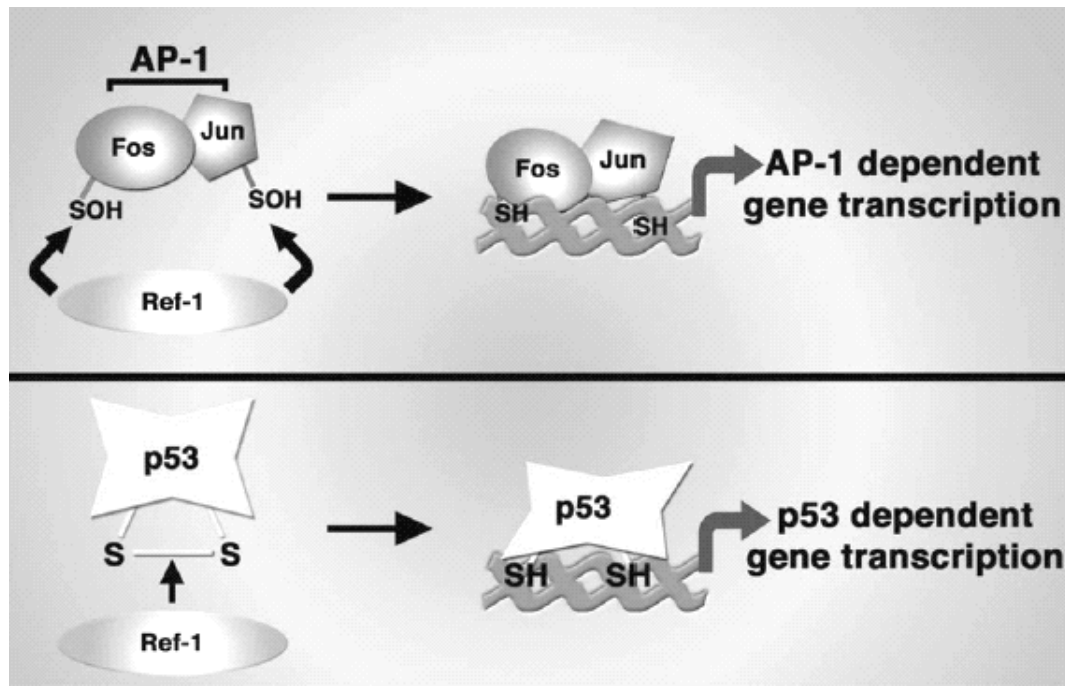
early response genes



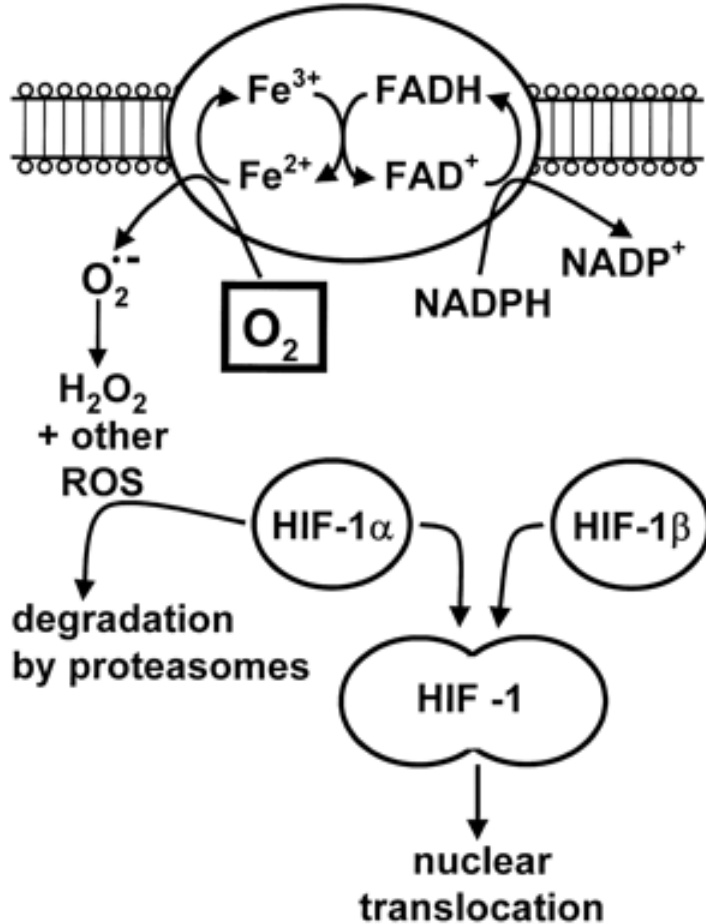
Redox faktor-1 (Ref-1)

Bifunkční enzym – DNA reparace a přímá modulace aktivity transkripčních faktorů

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).
2. 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 α and HIF-1 β , the genes of which are both constitutively expressed. Changes in oxygen tension fail to affect the concentration of HIF-1 β , whereas HIF-1 α 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 is the factor that binds to this element.

Trx (thioredoxin) oxidoreduktasa

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

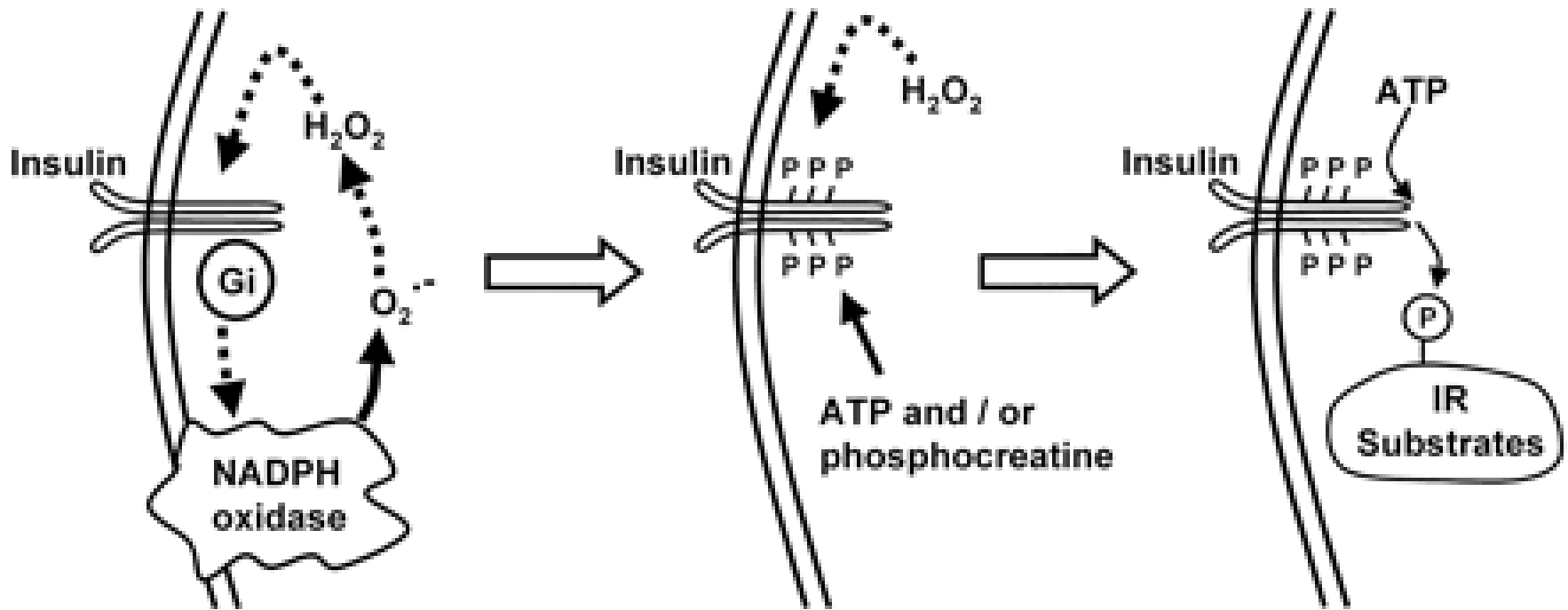
Trx + glutathionový systém hrají klíčovou úlohu v udržování redukujícího intracelulárního redoxního stavu.

Promotor Trx genu má vazebná místa pro AP-1 a NF-kappaB

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

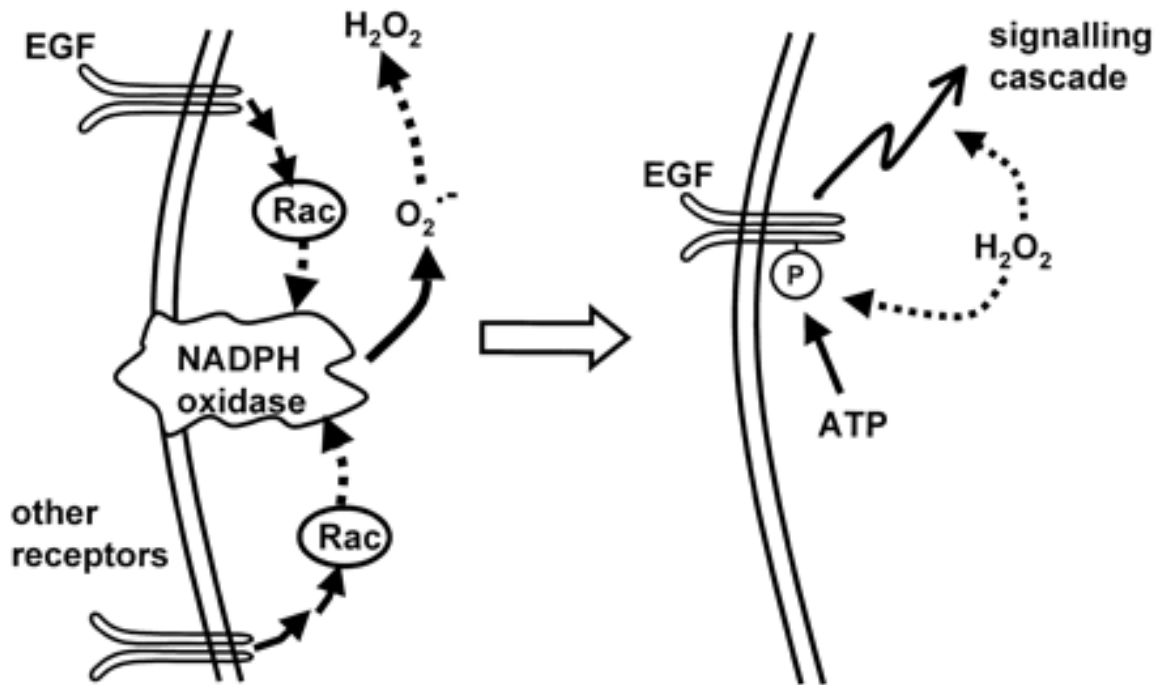
Protože plasmatická koncentrace redukovaného cysteinu je nízká, cystinový transportér má klíčovou roli v zásobování cysteinem a v biosyntéze glutathionu

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.

