



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ
ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΕΚΤΙΘΕΝΤΑΙ
ΣΕ H₂O₂: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΙΔΗΡΟΥ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΚΙΑΔΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ
ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΕΚΤΙΘΕΝΤΑΙ
ΣΕ H₂O₂: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΙΔΗΡΟΥ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΚΙΑΔΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Αφιερωμένο στους γονείς μου,

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Γαλάρη και χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 2003 (Κωδ. Έργου: 03ΕΔ478:Μέτρο/Δράση:8.3.1).

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθ. Δημήτριο Γαλάρη για την έμπνευση, τις εύστοχες υποδείξεις και την ακούραστη καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής. Τις ευχαριστίες μου απευθύνω επίσης και στα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής για την διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Λέκτορα Αλεξάνδρα Μπαρμπούτη η οποία ήταν πάντα παρούσα να ακούει με προσοχή κάθε απορία ή δυσκολία που αντιμετώπιζα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους Διδάκτορες Μαρία Μελίδου και Χρήστο Αμοργιαννιώτη για τις ουσιαστικές συμβουλές τους. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον υποψήφιο Διδάκτορα Μιχάλη Μάντζαρη, ο οποίος με βοηθούσε και με στήριζε καθημερινά αλλά κυρίως με έκανε να χαμογελώ κάθε φορά που υπήρχαν δυσκολίες. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Σοφία Ζωγράφου, την Νατάσσα Εμμανουιλίδου και την Κατερίνα Γεωργοπούλου για όλες τις όμορφες στιγμές που έχουμε περάσαμε μέσα και έξω από το εργαστήριο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης και όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας για τη βοήθεια και το όμορφο κλίμα που δημιουργούσαν. Τέλος, ευχαριστώ τις πολυαγαπημένες μου φιλενάδες Άντζυ, Κατερίνα και Ντίνα οι οποίες με «ανέχθηκαν» σε όλες τις στιγμές μου καθώς και τον Νικόλα ο οποίος με στήριξε ουσιαστικά.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Διδάκτορα Σοφία Μπέλλου για την πραγματικά απλόχερη βοήθεια που μου προσέφερε αλλά κυρίως για την άψογη και φιλική συνεργασία που είχαμε, τα αποτελέσματα της οποίας, συνέβαλαν ουσιαστικά στην εξέλιξη της παρούσας διατριβής.

Περισσότερο από όλους, θέλω να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τους γονείς μου Πάνο και Κυριακή και τα αδέρφια μου Κατερίνα και Σωτήρη οι οποίοι μου έχουν προσφέρει τα πάντα...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	i
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Ελεύθερες ρίζες, Οξειδωτικό Στρες και Μεταγωγή Σήματος.....	1
1.1.1 Ιστορική Ανασκόπηση ελευθέρων ριζών.....	1
1.1.2 Ορισμός και Χημεία ελευθέρων ριζών.....	1
1.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου.....	2
1.2.1 Οξυγόνου και εξέλιξη της ζωής.....	2
1.2.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ΔΜΟ).....	4
1.2.3 Τοξικότητα Δραστικών Μορφών Οξυγόνου.....	6
1.2.4 Δημιουργία Δραστικών Μορφών Οξυγόνου.....	7
1.2.5 Απομάκρυνση Δραστικών Μορφών Οξυγόνου.....	8
1.2.6 Επιπτώσεις από τις αλλαγές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου..	11
1.3 Φυσιολογικός ρόλος των Δραστικών Μορφών Οξυγόνου.....	12
1.4 Το H₂O₂ ως δεύτερος διαμεσολαβητής στην μεταγωγή σημάτων.....	14
1.4.1 Μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB.....	14
1.4.2 TNF-α.....	16
1.4.3 Akt (Κινάση κυτταρικής Επιβίωσης).....	17
1.4.4 Τυροσινικές Κινάσες.....	18
1.4.5 Τυροσινικές Φωσφατάσες.....	18
1.4.6 Οξείδωση σουλφιδριλικων ομάδων.....	19
1.5 Οξειδωτικό Στρες και Απόπτωση.....	21
1.6 Φυσιολογική σημασία της απόπτωσης.....	21
1.7 Μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης.....	22
1.7.1 Ο καταρράκτης των κασπασών.....	22
1.7.2 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων.....	23
1.7.3 Η οικογένεια ογκοπρωτεϊνών Bcl-2.....	24
1.7.3.1 Αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2.....	25
1.7.3.2 Προαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2.....	25
1.8 Η οικογένεια των MAPK.....	27
1.8.1 c-Jun N-terminal Kinase (JNK).....	29
1.8.2 JNK και απόπτωση.....	30
1.9 ASK-1.....	33

1.10 MAP φωσφατάσες.....	35
<i>1.10.1 DUSP1 και απόπτωση.....</i>	<i>36</i>
1.11 Σίδηρος και Μεταγωγή Σήματος.....	36
1.11.1 Οξειδοαναγωγικά Ενεργός Σίδηρος.....	37
1.11.2 Ρύθμιση των ενδοκυττάρων επιπέδων σιδήρου.....	38
1.11.3 Σιδηροδεσμευτικές ενώσεις-Δεσφεριοξαμίνη.....	40
1.11.4 Σίδηρος και Μεταγωγή Σημάτων-Αναπάντητα Ερωτήματα.....	42
ΣΚΟΠΟΣ.....	44
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
2.1 Υλικά.....	45
2.2 Καλλιέργειες κυττάρων.....	46
2.2.1 Διατήρηση κυτταρικών σειρών.....	46
2.2.2 Κυτταρικές σειρές και συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας.....	47
2.2.3 Διαμόλυνση κυττάρων.....	48
2.2.4 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων.....	48
2.3 Μέθοδοι.....	48
2.3.1 Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση κυτταρικού DNA.....	48
2.3.2 Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.....	50
2.3.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	52
2.3.4 Ανοσοκαθίζηση πρωτεϊνών.....	54
2.3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου απουσία αναγωγικών παραγόντων (Non-Reducing SDS-PAGE).....	54
2.3.6 Φθορισμομετρικός προσδιορισμός της ενεργότητας των κασπασών-3 και -9.....	55
2.3.7 Κυτταρομετρία ροής.....	56
2.3.7.1 Σήμανση με Annexin/PI.....	56
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	58
3.1 Η δέσμευση του σιδήρου αναστέλλει την δημιουργία ενδομοριακών σχάσεων στο πυρηνικό DNA.....	58
3.2 Η δέσμευση του σιδήρου αναστέλλει την εξωτερίκευση της φωσφατιδιλοδερίνη	60
3.3 Η δέσμευση του σιδήρου αναστέλλει την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών.....	62
3.4 Ο ρόλος των ιόντων σιδήρου στην αποσταθεροποίηση των μιτοχονδρίων	64

3.5 Συμμετοχή των MAP κινασών στην απόπτωση που προκαλείται από το H ₂ O ₂ και ο ρόλος των ιόντων σιδήρου.....	66
3.6 Τα ιόντα σιδήρου εμπλέκονται στον μηχανισμό ενεργοποίησης της ASK1.....	69
3.7 Το H ₂ O ₂ προκαλεί την οξειδωση της DUSP1.....	73
3.8 Η δέσμευση του σιδήρου αναστέλλει την οξειδωση της DUSP1.....	77
3.9 Η κυστεΐνη του ενεργού κέντρου της DUSP1 (Cys258), δεν είναι η μοναδική κυστεΐνη που μπορεί να οξειδώνεται.....	79
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	82
4.1 Η παρουσία ιόντων σιδήρου είναι απαραίτητη για την εκτέλεση της αποπτωτικής διαδικασίας.....	82
4.2 Ο ρόλος του σιδήρου στην ενεργοποίηση της JNK.....	84
4.3 Ο ρόλος του σιδήρου στην ενεργοποίηση της ASK-1.....	85
4.4 Επιπτώσεις του H ₂ O ₂ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση της φωσφατάσης DUSP1.....	87
4.5 Τα ιόντα σιδήρου επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση της φωσφατάσης DUSP1.....	90
4.6 Προτεινόμενος μηχανισμός οξειδωσης σουλφιδριλικών ομάδων.....	91
4.7 Προτεινόμενος ρόλος των ιόντων σιδήρου στο μοριακό μηχανισμό πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου από το H ₂ O ₂	94
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	97
6. SUMMARY.....	99
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	101

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Ac-DEVD-AMC: Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-Methyl-Coumarin

Ac-LEHD-AFC: Acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-Amino-4-Methyl-Coumarin

Apaf-1: Apoptotic-protease activating factor-1

APS: ammonium persulfate, υπερ-θειικό αμμώνιο

ASK1: Apoptosis Signal-regulating Kinase1

BSA: Bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός

CARD: Caspase recruitment domain

CAT: Catalase

CHAPS: (3-[(3-cholamidoproyl) dimethylammonio]-1 propanesulfonate

AMO: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

DED: Death Effector Domain

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DMT1: Divalent Metal Transporter-1

DFO: Desferrioxamine mesilate

DTT: Διθειοθρεϊτόλη

DUSPs: Dual Specificity Phosphatases

EDTA: Ethylenetriamineteteraacetic acid, αιθυλένο-τριάμινο-τετραοξικό οξύ

EGF: Epidermal Growth Factor

ERK: Extracellular signal-regulated kinases

FADD: Fas associated death domain

FCS: Fetal bovine calf serum, ορός εμβρύου μόσχου

FT: φερριτίνη

GPx: Περοξειδάση της γλουταθειόνης

GRX: γλουταρεδοξίνη

IAPs: Inhibitors of Apoptotic Proteases

ICAD: Inhibitor of Caspase Activated Deoxyribonuclease

IFN-γ: Ιντερφερόνη-γ

IKKs : ΙκΒ kinases

IL-1: Ιντερλευκίνης-1

IRK: Insulin, receptor kinase,

JNK: c-Jun N-terminal kinases

LIP: Labile Iron Pool

LMW-PTP: Low-molecular Proteins-PTP

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MEKK1: MEK kinase 1
MKPs: MAP kinase phosphatases
MPTP: Mitochondrion Permeability Transition Pore
NEM: N-Ethylmaleimide
NF- κ B: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PBS: Phosphate buffer saline
PDGF: Platelet Derived Growth Factor
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PKC: Protein kinase C
PMSF: phenylmethyl sulfonyl fluoride
PP2C: Protein phosphatase 2C
PP5: Protein phosphatase 5
PRx: Περοξειρεδοξίνη
PTEN: Phosphatase and Tensin homolog
RTKs: Receptor Tyrosine Kinases
PTP1B: Protein Tyrosine Phosphatase 1B
PTPs: Protein Tyrosine Phosphatases
RIP: Receptor-Interacting Protein
RTKs: Receptor Tyrosine Kinases
RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute Media 1640
SAPK: Stress Activated Protein Kinases
SHP-2: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases
SDS: Sodium dodecacyl sulphate
SODs: Superoxide Dismutase
STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription
TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
TRAF: TNF Receptor Associated Factor
TRADD: TNF receptor associated death domain
TFR: υποδοχέας της τρανσφερρίνης
Tris: Τρις-υδροξύμεθυλένο-διαμίνη
Trx: Θειορεδοξίνη

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες, Οξειδωτικό Στρες και Μεταγωγή Σημάτων

1.1.1.Ιστορική ανασκόπηση ελευθέρων ριζών

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη ελευθέρων ριζών ιστορικά ξεκινούν από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα. Το ενδιαφέρον για τις ελεύθερες ρίζες ουσιαστικά αναπτύχθηκε με την εργασία του Moses Gomberg, ο οποίος το 1900 απέδειξε την ύπαρξη της τριφαινυλομεθυλο-ρίζας $(C_6H_5)_3C\cdot$ (Gomberg M, 1900). Το 1946, ο Michaelis πρότεινε ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι ενδιάμεσα προϊόντα σε μεταβολικά μονοπάτια των βιολογικά ενεργών κυττάρων (Michaelis L, 1946). Η σημαντική αυτή πρόταση παρόλα αυτά αντιμετωπίστηκε με μεγάλο σκεπτικισμό από τους βιοχημικούς της εποχής του. Η πραγματικά συναρπαστική ιστορία των ελευθέρων ριζών ξεκινά το 1969 όταν οι McCord και Fridovich ανακάλυψαν μια πρωτεΐνη που περιείχε στο ενεργό της κέντρο ψευδάργυρο (Zn) και χαλκό (Cu) και κατέλυε την μετατροπή του ανιόντος του σουπεροξειδίου (O_2^-) σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) (McCord and Fridovich, 1969). Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD). Σήμερα είναι πλέον γνωστό ότι οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου σε συνεργασία με ένζυμα που απομακρύνουν το H_2O_2 , όπως η καταλάση, οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης και οι περοξυρεδοξίνες παρέχουν ένα πρωτογενές προστατευτικό φράγμα έναντι της τοξικότητας των ελευθέρων ριζών και άλλων δραστικών μορίων που σχηματίζονται με την μερική αναγωγή του οξυγόνου στα κύτταρα των θηλαστικών.

1.1.2 Ορισμός και χημεία ελευθέρων ριζών

Ελεύθερη ρίζα (free radical) είναι κάθε είδος ατόμου ή μορίου που μπορεί να είναι αυθύπαρκτο και περιέχει περιττό αριθμό ηλεκτρονίων σθένους, δηλαδή διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε κάποιο τροχιακό του. Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο καλείται αυτό που καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό.

Οι ελεύθερες ρίζες παριστάνονται με μία τελεία πάνω (δεξιά ή αριστερά) από το χημικό τύπο του ατόμου ή μορίου. Μερικά παραδείγματα των πιο γνωστών

ελευθέρων ριζών αποτελούν: το άτομο του υδρογόνου ($\text{H}\cdot$), το ανιόν του σουπεροξειδίου (O_2^-), η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), οι υπεροξυλικές ρίζες ($\text{RO}_2\cdot$), οι αλκοξυλικές ρίζες ($\text{RO}\cdot$) και τα οξειδία του αζώτου ($\text{NO}\cdot$ και $\text{NO}_2\cdot$).

Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών μπορεί να γίνει με τους εξής τρόπους:

1. Με απώλεια ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $\text{X} \rightarrow \text{e}^- + \text{X}^+$
2. Με προσθήκη ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $\text{Y} + \text{e}^- \rightarrow \text{Y}^-$
3. Με ομολυτική σχάση ομοιοπολικού δεσμού: $\text{A}:\text{B} \rightarrow \text{A}\cdot + \text{B}\cdot$

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να είναι είτε φορτισμένες (θετικά ή αρνητικά) είτε ουδέτερες. Οι σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες και ειδικότερα αυτές με μικρό μοριακό βάρος είναι συνήθως εξαιρετικά δραστικές, λόγω της τάσης του ασύζευκτου ηλεκτρονίου τους να αποσπά ένα ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια συμπληρώνοντας έτσι την ηλεκτρονιακή τους στοιβάδα, και για τον λόγο αυτό ο χρόνος ημιζωής τους είναι πολύ σύντομος (συνήθως $<10^{-3}\text{s}$). Ωστόσο, υπάρχουν εξαιρέσεις ελευθέρων ριζών οι οποίες μπορεί να είναι σχετικά σταθερές, όπως το O_2^- και το $\text{NO}\cdot$.

1.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ΔΜΟ)

1.2.1 Οξυγόνο και εξέλιξη της ζωής

Η ζωή στη Γη παρουσιάζει μια εξελικτική πορεία, που σύμφωνα με τις επικρατούσες θεωρίες ξεκίνησε πριν από περίπου 3,7 δισεκατομμύρια χρόνια. Αρχικά σχηματίστηκαν προβιοτικές οργανικές ουσίες κάτω από συνθήκες υψηλής ενέργειας (θερμότητα από ηφαίστεια, ηλεκτρικές εκκενώσεις, υπεριώδεις ακτινοβολίες) από απλές ουσίες όπως το μεθάνιο, η αμμωνία, το υδρόθειο, το διοξείδιο και μονοξείδιο του άνθρακα, η φορμαλδεΰδη και το υδροκυάνιο. Παράλληλα, η αφθονία του νερού στη Γη ευνόησε τη διατήρηση και τη χημική εξέλιξη αυτών των προβιοτικών ουσιών καθώς αρκετές αντιδράσεις για τη σύνθεση απλών αμινοξέων, αλδεϋδών, καρβοξυλικών οξέων και άλλων οργανικών μορίων έγιναν σε υδατικά διαλύματα με ενέργεια που προήλθε από θερμές πηγές, ακτινοβολίες και ηλεκτρικές εκκενώσεις. Η προβιοτική αυτή «πρωτόγονη σούπα» οργανικών ουσιών πέρασε σημαντικές

ανακατατάξεις και μεταμορφώσεις με τη δημιουργία μυκηλίων- μικροσφαιριδίων, όπως και «οργανικών σταγονιδίων» ποικίλων οργανικών ουσιών. Ακολούθησαν πολυάριθμες και σύνθετες καταλυτικές δράσεις μετάλλων (κυρίως οξειδοαναγωγικές), πυριτικών ορυκτών και των αλάτων τους στις όχθες λιμνών, ποταμών και σε υδατικά συστήματα που δημιούργησαν κάποια μορφή προβιοτικών οργανισμών. Οι προβιοτικοί «οργανισμοί» πρέπει να είχαν πρωτόγονη δομή με απλές μεταβολικές ενδογενείς διεργασίες και υδατοδιαλυτή διατροφική επαφή με το περιβάλλον. Αρχικά υπήρξαν προκαρυωτικοί οργανισμοί χωρίς πυρήνα που αργότερα εξελίχθηκαν σε ευκαρυωτικούς. Οι θεωρίες αυτές για την δημιουργία της ζωής δεν είναι απόλυτα τεκμηριωμένες λόγω της έλλειψης ευρημάτων από αυτή την φάση της εξέλιξης.

Οι αρχικοί ζωντανοί οργανισμοί ήταν αναερόβιοι εξαιτίας της έλλειψης οξυγόνου και μπορούσαν να παράγουν παραπροϊόντα όπως σουλφίδια, νιτρώδη και αλκοόλες. Περίπου πριν από 2,5 δισεκατομμύρια χρόνια, υπολογίζεται ότι εμφανίστηκαν τα κυανοβακτήρια που απέκτησαν εξελικτικά την ικανότητα να διασπούν το νερό σε υδρογόνο και οξυγόνο. Με την εμφάνιση του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα, οι αναερόβιοι οργανισμοί οι οποίοι επικρατούσαν «υποχρεώθηκαν» είτε να εξαφανιστούν είτε να αποτραβηχθούν σε σημεία όπου δεν μπορούσε να φτάσει το οξυγόνο. Η αργή πορεία της εξέλιξης από τις αναερόβιες στις αερόβιες συνθήκες έδωσε την ευκαιρία σε ορισμένες μορφές ζωής να προσαρμοστούν εκφράζοντας ειδικά αντιοξειδωτικά συστήματα τα οποία προστάτευαν από τις τοξικές επιδράσεις του οξυγόνου. Παράλληλα με την εξέλιξη των αντιοξειδωτικών αυτών μηχανισμών, οι αερόβιοι οργανισμοί κατόρθωσαν να αναπτύξουν μηχανισμούς που τους επέτρεψαν να χρησιμοποιούν το οξυγόνο και για τον μεταβολικό τους μετασχηματισμό

Όταν το επίπεδο της συγκέντρωσης του οξυγόνου έφθασε στο 10% (υπολογίζεται ότι αυτό συνέβη πριν από 500 εκατομμύρια χρόνια) άρχισε να σχηματίζεται το πρώτο στρώμα του όζοντος στη στρατόσφαιρα το οποίο απορρόφησε ικανοποιητικά το τμήμα της βλαβερής υπεριώδους ακτινοβολίας και επέτρεψε την έξοδο από το νερό και την εμφάνιση των πρώτων έμβιων οργανισμών στην ξηρά. Με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα και όντας το διαλυμένο μέρος του στα νερά, οι οργανισμοί άρχισαν να προσαρμόζονται στη χρήση του για μεταβολικούς μηχανισμούς και ενέργεια αλλά συγχρόνως προώθησαν τη δημιουργία ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών για την προστασία τους

από την τοξικότητά του. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν αερόβιοι οργανισμοί που χρησιμοποιούν το οξυγόνο αλλά και προστατεύονται σε σημαντικό βαθμό από τις τοξικές δράσεις του.

Ο συνδυασμός αντιοξειδωτικών δράσεων και μεταβολισμού του οξυγόνου με χαμηλή τοξικότητα συνέβαλε σε σημαντικό βαθμό στη μακροβιότητα του ανθρώπου και άλλων ζώων. Η συγκέντρωση οξυγόνου στην ατμόσφαιρα ήταν κατά περιόδους και μεγαλύτερη αλλά τελικά σταθεροποιήθηκε στη σημερινή που κυμαίνεται περίπου στο 21%. Το οξυγόνο πλέον αποτελεί το δεύτερο σε αφθονία συστατικό του αέρα μετά το άζωτο (78%)

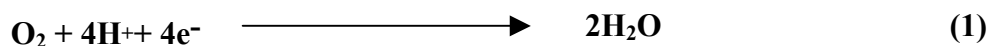
1.2.2 Δραστικές μορφές Οξυγόνου (ΔΜΟ)

Παρά το γεγονός ότι το οξυγόνο αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα ύπαρξης της ζωής, η αφθονία του στα βιολογικά συστήματα σε συνδυασμό με την ικανότητά του να ανάγεται με μονά ηλεκτρόνια, το καθιστούν τον κυριότερο παράγοντα δημιουργίας ελευθέρων ριζών στις αερόβιες μορφές ζωής (Bruyninckx et al., 1978). Το οξυγόνο ουσιαστικά είναι διπλή ελεύθερη ρίζα αφού έχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια σε ξεχωριστά τροχιακά που καταλαμβάνουν το καθένα ένα διαφορετικό μοριακό τροχιακό και έχουν στροφορμές (spin) ίδιας κατεύθυνσης. Αυτή είναι η βασική (μη διεγερμένη) κατάσταση του οξυγόνου (ground-state O_2) και είναι αρκετά σταθερή. Για να οξειδώσει το O_2 ένα άλλο άτομο ή μόριο αποσπώντας του δύο ηλεκτρόνια θα πρέπει και τα δύο αυτά ηλεκτρόνια να έχουν αντίθετη στροφορμή ως προς αυτή των ασύζευκτων ηλεκτρονίων του O_2 . Ο περιορισμός αυτός (spin restriction), εξηγεί την αδυναμία του O_2 να προσβάλλει απευθείας τα διάφορα βιολογικά μόρια και γενικότερα ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες,

Στα μιτοχόνδρια, ο βασικός ρόλος του O_2 είναι να δρα σαν αποδέκτης των ηλεκτρονίων που απελευθερώνονται από τις οξειδωτικές διεργασίες του καταβολισμού (Halliwell B, 1984). Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την φυσιολογική αναγωγή του O_2 είναι η κυτοχρωμική οξειδάση που αποτελεί το τελευταίο ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας.

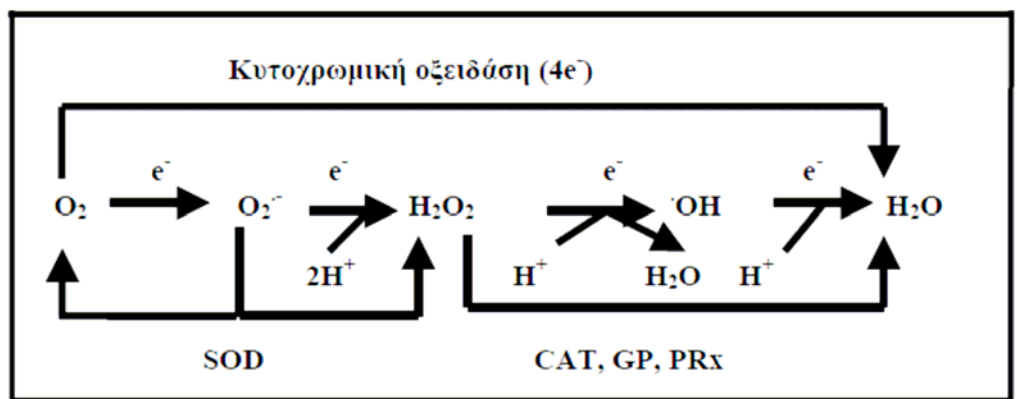
Το ένζυμο αυτό λαμβάνει 4 ηλεκτρόνια από 4 μόρια κυτοχρώματος C και τα χρησιμοποιεί για την αναγωγή ενός μορίου O_2 προς δύο μόρια H_2O (αντίδραση 1) :

κυτοχρωμική οξειδάση



Το σύμπλοκο της κυτοχρωμικής οξειδάσης έχει 2 μόρια αίμης και δύο άτομα Cu και επιτρέπει την ταυτόχρονη μεταφορά και των τεσσάρων ηλεκτρονίων στο O_2 πριν το τελικό προϊόν της αντίδρασης (H_2O) αφεθεί ελεύθερο.

Ένα μικρό μέρος όμως του προσλαμβανόμενου O_2 στα μιτοχόνδρια (περίπου 0,1-1,0 %) ανάγεται ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες με μονά ηλεκτρόνια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Το αναγωγικό περιβάλλον που επικρατεί στα κύτταρα προσφέρει τη δυνατότητα για την αναγωγή του O_2 με ένα ηλεκτρόνιο, σχηματίζοντας αρχικά το ανιόν του σουπεροξειδίου (O_2^-) το οποίο όπως προαναφέρθηκε είναι μεν ελεύθερη ρίζα αλλά όχι ιδιαίτερα δραστική. Η προσθήκη ενός ακόμη ηλεκτρονίου στο O_2^- δίνει O_2^{2-} ή H_2O_2 (πρωτονιομένη μορφή του O_2^{2-}). Αναγωγή του H_2O_2 με ένα ακόμη ηλεκτρόνιο σχηματίζει την ιδιαίτερα δραστική ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) που αποτελεί έναν από τους πιο δραστικούς οξειδωτικούς παράγοντες που δημιουργούνται in vivo. Τέλος, προσθήκη ενός ακόμη ηλεκτρονίου καταλήγει στο σχηματισμό του H_2O .



Εικόνα 1: Σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου με μονά ηλεκτρόνια σε H_2O

Κατά αυτό τον τρόπο, ενώσεις, όπως το O_2^- , το H_2O_2 και η εξαιρετικά δραστική ρίζα του υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) μπορούν να θεωρηθούν κανονικά προϊόντα της καθημερινής αερόβιας ζωής. Στον Πίνακα 1 αναφέρονται μια σειρά από ενώσεις του O_2 , οι οποίες είναι δυνατόν να συμμετέχουν σε τοξικές για τα κύτταρα αντιδράσεις και οι οποίες ονομάζονται “Δραστικές Μορφές Οξυγόνου” (Reactive Oxygen Species, ROS).

Μοριακός Τύπος	Όνομα
<u>Ελεύθερες Ρίζες</u>	
$O_2^{\cdot -}$	ανιόν σουπεροξειδίου
HO_2^{\cdot}	υδροϋπεροξειδική ρίζα
$\cdot OH$	ρίζα υδροξυλίου
RO^{\cdot}	ρίζα αλκοξειδίου
ROO^{\cdot}	ρίζα υπεροξειδίου
<u>Μη ελεύθερες ρίζες</u>	
H_2O_2	υπεροξείδιο του υδρογόνου
$ROOH$	οργανικά υπεροξείδια
1O_2	μονήρες οξυγόνο
O_3	όζον
$HOCl$	υποχλωριώδες οξύ

Πίνακας 1: Αντιπροσωπευτικές «Δραστικές μορφές Οξυγόνου»

1.2.3 Τοξικότητα Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

Η πρώτη ΔΜΟ που δημιουργείται στις περισσότερες περιπτώσεις είναι το $O_2^{\cdot -}$, το οποίο μετατρέπεται σε H_2O_2 μέσω των ενζύμων SODs. Ωστόσο, ούτε το $O_2^{\cdot -}$ ούτε το H_2O_2 είναι ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες και επομένως από μόνα τους δεν μπορούν να αντιδράσουν με ενδοκυττάρια συστατικά. Το 1894 ο H.J.H. Fenton περιέγραψε την αντίδραση ενός μείγματος H_2O_2 με άλατα δισθενούς σιδήρου τα προϊόντα της οποίας μπορούσαν να οξειδώσουν ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών οργανικών μορίων (Fenton, 1894). Αν και είναι πιθανό να εμπλέκονται αρκετοί ενδιάμεσοι παράγοντες, ο καλύτερα μελετημένος είναι η ρίζα του υδροξυλίου ($\cdot OH$) (αντίδραση 2) :



Οι $\cdot OH$ λόγω της μεγάλης δραστικότητας τους δεν προλαβαίνουν να διαχυθούν αλλά αντιδρούν με οτιδήποτε βρίσκεται δίπλα τους κατά την στιγμή της δημιουργίας τους. Κατά συνέπεια, μπορούν να οξειδώσουν οποιοδήποτε κυτταρικό συστατικό και να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες στο DNA των κυττάρων,

λιπιδιακή υπεροξειδωση σε λιπίδια μεμβρανών, αλλοιώσεις στην δομή πρωτεϊνών και βλάβες σε υδαάνθρακες (Chevion, 1988; Gutteridge and Halliwell, 1982; Halliwell and Aruoma, 1991; Halliwell and Gutteridge, 1990; Henle et al., 1999; Meneghini, 1997; Stohs and Bagchi, 1995).

Μολονότι υπάρχουν και άλλα μέταλλα, όπως ο χαλκός, που μπορούν να καταλύουν την παραπάνω αντίδραση, ο σίδηρος λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του στα κύτταρα, θεωρείται ο βασικός καταλύτης της παραπάνω αντίδρασης στα βιολογικά συστήματα.

1.2.4 Δημιουργία Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

Μια από τις σημαντικότερες πηγές δημιουργίας ΔΜΟ, είναι τα μιτοχόνδρια. Παρότι, η κυτοχρωμική οξειδάση ανάγει το O_2 σε H_2O , χωρίς την απελευθέρωση ανιχνεύσιμων ενδιάμεσων μορφών αναγωγής, ένα μικρό ποσοστό ηλεκτρονίων διαφεύγει από την κύρια οδό της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα τη μονοσθενή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου και τον τελικό σχηματισμό του ανιόντος του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) (Lenaz, 2001). Αν και δεν είναι γνωστό ακριβώς το σημείο διαρροής των ηλεκτρονίων, οι πρωτεΐνες του συμπλόκου I και η ελεύθερη ρίζα του συνενζύμου Q φαίνεται να είναι υπεύθυνες στις περισσότερες περιπτώσεις. Εκτός από τα μιτοχόνδρια, έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχουν και άλλα κυτταρικά οργανίδια που μπορούν να παράγουν χαμηλές ποσότητες ΔΜΟ, μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων τους, όπως είναι το ενδοπλασματικό δίκτυο (Malhotra and Kaufman, 2007) και ο πυρήνας (Peskin et al., 1980).

Μία άλλη εξίσου σημαντική πηγή δημιουργίας μικρών ποσοτήτων ΔΜΟ στα κύτταρα, θεωρείται μια οικογένεια ενζύμων οι NAD(P)H οξειδάσες (Banfi et al., 2003; Geiszt et al., 2003; Takeya et al., 2003), παρόμοιες με την NADPH οξειδάση των φαγοκυττάρων, οι οποίες έχουν εντοπιστεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όλων σχεδόν των κυττάρων. Αν και οι μοριακοί μηχανισμοί ενεργοποίησης αυτής της οικογένειας οξειδασών (Noxs) δεν είναι ακόμη πλήρως αναγνωρισμένοι, υποστηρίζεται ότι η δέσμευση προσδεμάτων, όπως αυξητικών παραγόντων, ορμονών, ή κυτοκινών, στους αντίστοιχους υποδοχείς τους στην κυτταρική μεμβράνη συνδέονται με κάποιον τρόπο με την ενεργοποίησή τους.

Ένας άλλος τρόπος παράγωγής ΔΜΟ είναι μέσω του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, σε αντιδράσεις που καταλύονται από την κυκλοξυγενάση και τις λιποξυγενάσες ενώ θα πρέπει ακόμη να αναφερθεί ότι αύξηση της δημιουργίας ΔΜΟ στα κύτταρα μπορεί να προκληθεί και από άλλους παράγοντες όπως είναι η επίδραση ακτινοβολιών, η χορήγηση φαρμάκων και ο μεταβολισμός τοξικών ενώσεων.

1.2.5. Απομάκρυνση Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

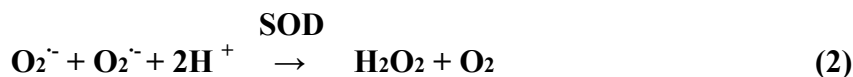
Από όσα αναφέρθηκαν μέχρι στιγμής είναι εμφανές ότι η δημιουργία ΔΜΟ στα κύτταρα των αερόβιων οργανισμών είναι συνεχής και λαμβάνει χώρα ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Η συσσώρευση ωστόσο αυτών των ενώσεων θα είχε καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο. Για να καταφέρουν οι αερόβιοι οργανισμοί να επιζήσουν, έχουν αναπτύξει ένα σύστημα αμυντικών μηχανισμών μέσω του οποίου εξισορροπούν την παραγωγή των ΔΜΟ, απομακρύνοντάς τες μόλις δημιουργηθούν. Υπάρχει δηλαδή μια λεπτή δυναμική ισορροπία ανάμεσα στην δημιουργία και την απομάκρυνση των ΔΜΟ στα κύτταρα η οποία καλείται «οξειδοαναγωγική ισορροπία».

Οι πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την απομάκρυνση αυτών των ενώσεων είναι κυρίως οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SODs), η καταλάση (CAT), οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPx) και οι περοξυρεδιζίνες (PRx).

Δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SODs)

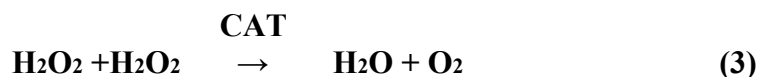
Οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SODs) καταλύουν την αντίδραση δύο μορίων O_2^- το ένα από τα οποία ανάγεται σε H_2O_2 (δέκτης ηλεκτρονίων) ενώ το άλλο οξειδώνεται σε O_2 (δότης ηλεκτρονίων), όπως φαίνεται στην αντίδραση (2) (McCord and Fridovich, 1969). Αν και η αντίδραση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί και μη ενζυμικά με υψηλή ταχύτητα, η παρουσία του ενζύμου αυξάνει την ταχύτητα της αντίδρασης περισσότερο από 10^4 φορές. Οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου έχουν ανιχνευθεί σχεδόν σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, στο κυτταροδιάλυμα σε μια μορφή που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο (CuZn-SOD) και στα μιτοχόνδρια με μια μορφή που περιέχει μαγγάνιο (Mn-SOD). Η υψηλή ταχύτητα της αντίδρασης σε συνδυασμό με την παρουσία της SOD σε όλα τα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα η

συγκέντρωση του $O_2^{\cdot -}$ να είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Έχει υπολογιστεί ότι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ισορροπίας (steady state) του $O_2^{\cdot -}$ παρουσία της SOD είναι περίπου ίση με 10^{-11} M.



Καταλάση (CAT)

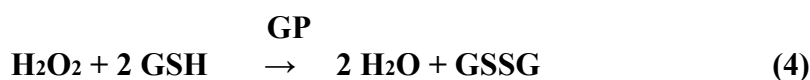
Η καταλάση είναι μια αιμοπρωτεΐνη που αντιδρά με το H_2O_2 σε οποιαδήποτε συγκέντρωσή του χωρίς να υφίσταται κορεσμό και καταλύει την αναγωγή του H_2O_2 με 2 ηλεκτρόνια προς H_2O (αντίδραση 3). Πιο συγκεκριμένα, η καταλάση χρησιμοποιεί το H_2O_2 τόσο σαν δότη όσο και σαν δέκτη ηλεκτρονίων. Το ένα μόριο H_2O_2 οξειδώνεται με δύο ηλεκτρόνια σε O_2 ενώ ταυτόχρονα το άλλο ανάγεται με 2 ηλεκτρόνια σε H_2O .



Η καταλάση απαντάται στα υπεροξεισώματα και έχει βρεθεί σχεδόν σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς. Οι πιο πολύ τύποι καταλάσης είναι τετραμερή με ένα μόριο αίμης στο ενεργό κέντρο κάθε υπομονάδας (Chance et al., 1979; Zamocky et al., 2008).

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP) είναι μια σεληνοπρωτεΐνη που ανευρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, αλλά και στα μιτοχόνδρια και τα υπεροξυσώματα. Το ένζυμο αυτό ανάγει το H_2O_2 σε H_2O οξειδώνοντας την γλουταθειόνη (GSH) σε δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG), όπως φαίνεται στην αντίδραση (4) :



Η οξειδωμένη γλουταθειόνη εν συνεχεία μπορεί και ανάγεται από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), χρησιμοποιώντας ως δότη ηλεκτρονίων το NADPH. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης εμφανίζει απόλυτη εξειδίκευση όσον αφορά την γλουταθειόνη αλλά μπορεί να ανάγει διαφορετικά υπεροξείδια όπως για παράδειγμα υπεροξείδια λιπαρών οξέων, οργανικά υπεροξείδια κ.α (Lu and Holmgren, 2009).

Περοξυρεδοξίνες (PRx)

Οι περοξυρεδοξίνες (peroxiredoxins, Prxs) συνιστούν μια οικογένεια πρωτεϊνών, των οποίων η σημασία στην αντιοξειδωτική άμυνα και στη μεταγωγή σημάτων έγινε πιο ξεκάθαρη τα τελευταία χρόνια (Rhee et al., 2001; Wood et al., 2003). Οι περοξυρεδοξίνες, που δρουν συνήθως ως ομοδιμερή, καταλύουν την αναγωγή του H₂O₂ σε H₂O χρησιμοποιώντας ως δότη ηλεκτρονίων την θειορεδοξίνη (Trx) (αντίδραση 5) :

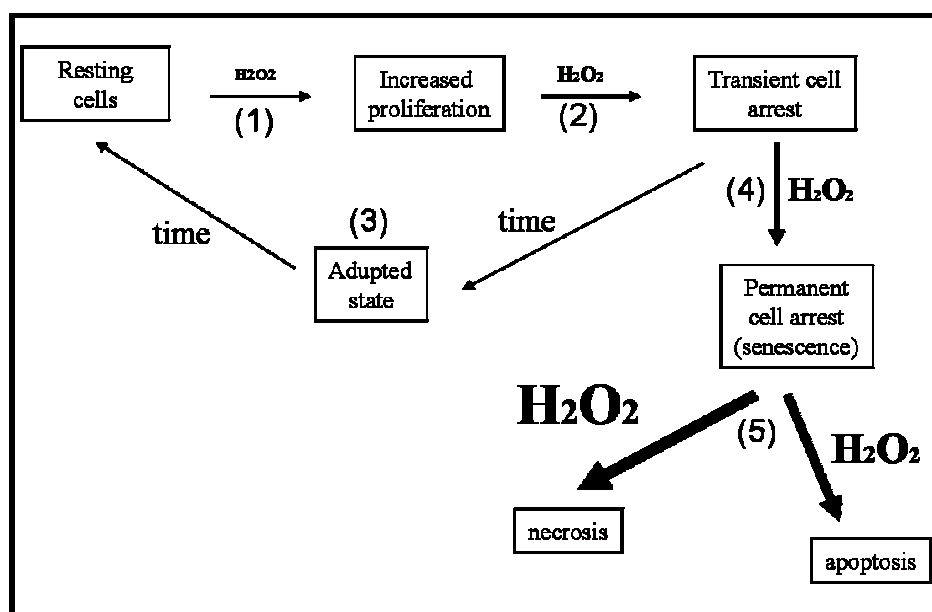


Κατά τη διαδικασία της κατάλυσης, μια κυστεΐνη (Cys52) στο ενεργό κέντρο της Prx οξειδώνεται σχηματίζοντας σουλφενικό οξύ (sulfenic acid, Prx-SOH) το οποίο με τη σειρά του αντιδρά με μια άλλη κυστεΐνη (Cys 173) της άλλης υπομονάδας του μορίου προς σχηματισμό δισουλφιδίου (Prx-S-S-Prx). Το δισουλφίδιο επανανάγεται από την Trx η οποία οξειδώνεται προς δισουλφίδιο. Εντούτοις όταν η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι ιδιαίτερα υψηλή, τότε η Prx-SOH οξειδώνεται περαιτέρω προς σουλφινικό οξύ Prx-SO₂H. Αν και η οξείδωση αυτή θεωρείτο ως μια μη αντιστρεπτή τροποποίηση, πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένα ένζυμο, η σουλφιρεδοξίνη (Srx, sulfiredoxin), της οποίας ο ρόλος είναι η αναγωγή υπερ-οξειδωμένων περοξυρεδοξινών (Biteau et al., 2003; Chang et al., 2004).

1.2.6 Επιπτώσεις από τις αλλαγές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου

Όπως γίνεται κατανοητό, για την επίτευξη της λεγόμενης «οξειδοαναγωγικής ισορροπίας» μέσα στα κύτταρα θα πρέπει οι ΔΜΟ που δημιουργούνται, ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, να απομακρύνονται συνεχώς από τους αμυντικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι η οξειδοαναγωγική ισορροπία δεν είναι η ίδια σε όλα τα είδη κυττάρων. Εξαρτάται τόσο από την ταχύτητα δημιουργίας των ΔΜΟ όσο και από την ικανότητα των συγκεκριμένων κυττάρων να τις απομακρύνουν. Αλλά ακόμη και στα ίδια τα κύτταρα, η ισορροπία αυτή μπορεί να διαταράσσεται κάτω από ορισμένες συνθήκες. Στην περίπτωση που η ισορροπία ανάμεσα στους οξειδωτικούς παράγοντες και στην αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων διαταράσσεται/ανατρέπεται υπέρ των πρώτων, τότε προκαλείται μια κατάσταση που είναι γνωστή ως «οξειδωτικό στρες» (Sies and Cadenas, 1985)

Τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να “αντιλαμβάνονται” αλλαγές της οξειδοαναγωγικής τους κατάστασης και να αντιδρούν ανάλογα με την ένταση του οξειδωτικού στρες το οποίο δέχονται.



Εικόνα 2: Διαγραμματική απεικόνιση των κυτταρικών αποκρίσεων μετά από έκθεση τους σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2

Πιο συγκεκριμένα, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 2, η έκθεση κυττάρων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις εξωγενώς προστιθέμενου H_2O_2 έχει διαπιστωθεί ότι οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (1), ενώ λίγο υψηλότερες συγκεντρώσεις H_2O_2

προκαλούν μία προσωρινή αναστολή του πολλαπλασιασμού τους (transient cell arrest) (2) (Burdon and Rice-Evans, 1989; Davies, 1999; Davies, 2000; Wiese et al., 1995). Απομάκρυνση του H_2O_2 σε αυτό το σημείο έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να γίνονται πιο ανθεκτικά όταν εκτίθενται μετά από λίγο χρόνο ξανά στο ίδιο ερέθισμα, μία κατάσταση που χαρακτηρίζεται ως “προσαρμογή των κυττάρων” (adaptation) (3). Εάν τα κύτταρα δεν εκτεθούν ξανά σε H_2O_2 παρατηρείται ότι μετά από κάποιο χρονικό διάστημα επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση.

Στην περίπτωση όμως που το οξειδωτικό στρες είναι εντονότερο και τα κύτταρα δεν καταφέρουν να ανταπεξέλθουν πλήρως, τότε το αποτέλεσμα είναι μία μόνιμη αναστολή του πολλαπλασιασμού τους (permanent cell arrest)(4). Σε αυτήν την περίπτωση τα κύτταρα βρίσκονται σε μία κατάσταση παρόμοια με αυτή των γηρασμένων κυττάρων (senescence-like state). Τέλος, όταν η ένταση του οξειδωτικού στρες είναι ιδιαίτερα υψηλή, τότε τα κύτταρα οδηγούνται σε θάνατο είτε με απόπτωση είτε με νέκρωση (5) (Antunes and Cadenas, 2001; Chandra et al., 2000).

1.3 Φυσιολογικός ρόλος των Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

Η έρευνα γύρω από το οξειδωτικό στρες για αρκετές δεκαετίες είχε περιοριστεί στις απότομες αλλαγές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, που είχαν τοξικές επιπτώσεις για τα κύτταρα και οδηγούσαν στον θάνατο. Η ανίχνευση όμως μικρών μη τοξικών ποσοτήτων ΔΜΟ κάτω από φυσιολογικές συνθήκες σε όλα σχεδόν τα είδη κυττάρων έθεσε στην επιστημονική κοινότητα το ερώτημα για τους ρόλους που μπορούν να παίζουν αυτοί οι παράγοντες (Droge, 2002; Rhee et al., 2005).

Τα μιτοχόνδρια όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, αλλά και άλλα κυτταρικά οργανίδια όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο και ο πυρήνας έχουν την ικανότητα να παράγουν χαμηλές ποσότητες ΔΜΟ. Ένζυμα όπως η οξειδάση της ξανθίνης, καθώς και τα ένζυμα του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος παράγουν επίσης ΔΜΟ. Η σημαντικότερη όμως πηγή δημιουργίας ρυθμιζόμενων φυσιολογικών ποσοτήτων ΔΜΟ στα κύτταρα, θεωρείται μια οικογένεια ενζύμων (NAD(P)H οξειδάσες), παρόμοιες με την NADPH οξειδάση των φαγοκυττάρων που έχουν εντοπιστεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όλων σχεδόν των κυττάρων

(Bayraktutan et al., 2000; Fukui et al., 1997; Griendling et al., 1994; Tammariello et al., 2000; Ushio-Fukai et al., 1996).

Αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους αυτές οι NAD(P)H οξειδάσες ενεργοποιούνται είναι ακόμη υπό διερεύνηση, υποστηρίζεται ότι η δέσμευση προσδεμάτων σε υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης συνδέεται άμεσα με την ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων. Οι υποδοχείς κυτοκινών (cytokine receptor) όπως του TNF- α , της ιντερλευκίνης-1 (IL-1) και της ιντερφερόνης- γ (IFN- γ) ήταν από τους πρώτους που αναφέρθηκε ότι οδηγούν στην αύξηση ΔΜΟ σε μη-φαγοκύτταρα μέσω της ενεργοποίησης NAD(P)H οξειδάσων (Arai et al., 1998; De Keulenaer et al., 1998; Meier et al., 1991; Satriano et al., 1993). Αντίστοιχα, αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ΔΜΟ έχει αναφερθεί και για αυξητικούς παράγοντες. Δύο από τους πιο γνωστούς αυξητικούς παράγοντες, ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGF μετά την πρόσδεση τους στους αντίστοιχους RTKs (Receptor Tyrosine Kinases) προκαλούν την αύξηση της δημιουργίας O_2^- και H_2O_2 διαμέσου NAD(P)H οξειδάσων (Abid et al., 2001; Irani et al., 1997; Marumo et al., 1997; Sundaresan et al., 1995; Thannickal et al., 2000).

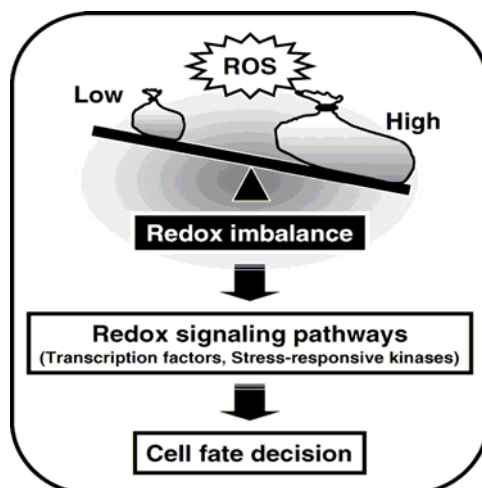
Η αύξηση της συγκέντρωσης ΔΜΟ φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την έναρξη μιας σειράς γεγονότων που έχουν σαν αποτέλεσμα την μεταφορά σημάτων από τη μεμβράνη στο εσωτερικό του κυττάρου (signal transduction) (Rhee, 1999). Τα σήματα αυτά ανάλογα με τον υποδοχέα μπορεί να σχετίζονται με την επιβίωση, την διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό ή ακόμη και με τον θάνατο των κυττάρων. Παραδείγματος χάριν, έχει βρεθεί ότι η παροδική αύξηση της συγκέντρωσης O_2^- και H_2O_2 μέσω μιας NAD(P)H οξειδάσης μετά την πρόσδεση αυξητικών παραγόντων στους υποδοχείς τους, είναι απαραίτητη για την μετάδοση του μιτογόνου σήματος. Η γρήγορη απομάκρυνση όμως των δημιουργούμενων ΔΜΟ με την υπερέκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως καταλάσης έχει ως αποτέλεσμα την διακοπή της σηματοδοτικής πορείας (Abid et al., 2001; Bae et al., 1997; Das et al., 1992; Irani et al., 1997; Marumo et al., 1997; Tammariello et al., 2000; Thannickal et al., 2000)

Μέσα από αυτές τις παρατηρήσεις, άρχισε σιγά-σιγά να διαμορφώνεται η ιδέα ότι η συνεχής δημιουργία και απομάκρυνση ΔΜΟ ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν ήταν μια τυχαία και βλαπτική ατέλεια η οποία ήταν συνυφασμένη με την αναγωγή του οξυγόνου αλλά αποτελεί μια δυναμική κατάσταση μέσω της οποίας είναι δυνατόν να ελέγχονται βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η

ενεργοποίηση ενζύμων, ο έλεγχος της δημιουργίας νέων πρωτεϊνών με έκφραση γονιδίων και τελικά μέσω αυτών, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση ή ακόμη και η απόπτωση των κυττάρων (Finkel, 2003; Martindale and Holbrook, 2002).

1.4 Το H_2O_2 ως δεύτερος διαμεσολαβητής στην μεταγωγή σημάτων

Σήμερα θεωρείται πλέον σαφές ότι η ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική κατάσταση (redox status) αποτελεί το βασικό ρυθμιστή της «τύχης» του κυττάρου καθώς αλλαγές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στη μεταγωγή σημάτων στα κύτταρα.



Εικόνα 3: Η οξειδοαναγωγική ισορροπία αποτελεί τον κεντρικό ρυθμιστή της «τύχης» του κυττάρου (Fujino et al., 2006)

Χαρακτηριστικά παραδείγματα που αποδεικνύουν την δράση του H_2O_2 ως δεύτερου διαμεσολαβητή σε σηματοδοτικές πορείες παρατίθενται παρακάτω.

1.4.1. Μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB

Ένα πρώτο παράδειγμα που τεκμηριώνει την άμεση εμπλοκή του H_2O_2 ως σηματοδοτικό μόριο σε πορείες μεταγωγής σημάτων αποτελεί το μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB (Baeuerle and Baltimore, 1988; Flohe et al., 1997; Janssen-Heininger et al., 2000; Schreck et al., 1991). Σε φυσιολογικές συνθήκες ο NF-κB εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή κατάσταση συνδεδεμένος με τον αναστολέα του IκB. Πειραματικές μελέτες στις αρχές του 1990 έδειξαν ότι η έκθεση

κυττάρων σε χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 ή σε ιονίζουσα ακτινοβολία προκάλεσαν την ενεργοποίηση του NF-κB μέσω της απομάκρυνσης του αναστολέα IκB από το σύμπλοκο του NF-κB (Baeuerle and Henkel, 1994; Schreck et al., 1991; Schulze-Osthoff et al., 1995). Επίσης πολλοί από τους παράγοντες που ενεργοποιούν τον NF-κB όπως για παράδειγμα ο TNF-α και η ILβ έχει αναφερθεί ότι ταυτόχρονα επάγουν την αύξηση των ενδοκυττάρων ΔΜΟ (Bonizzi et al., 1999; Park et al., 2004; Ryan et al., 2004; Sanlioglu et al., 2001; Sulciner et al., 1996), ενώ μια σειρά από διαφορετικούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες μπορούν να αναστείλουν την ενεργοποίησή του (Anderson et al., 1994; Brennan and O'Neill, 1995; Sappey et al., 1994; Schmidt et al., 1995; Staal et al., 1990). Πιστεύεται επομένως ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η ενεργοποίηση του NF-κB ρυθμίζεται από αλλαγές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (Pantano et al., 2006). Εφόσον η ενεργοποίηση του NF-κB είναι άμεσα συνδεδεμένη με την φωσφορυλίωση του IκB, τα ερεθίσματα που ενεργοποιούν το μεταγραφικό αυτό παράγοντα πρέπει είτε να ενεργοποιούν κάποια κινάση είτε εναλλακτικά να απενεργοποιούν κάποια φωσφατάση στη διαδικασία αυτή. Αν και η αποικοδόμηση και η απελευθέρωση του IκB από τον NF-κB από ενδιάμεσες συγκεντρώσεις H_2O_2 έχει προταθεί σε πολλές μελέτες (Pantano et al., 2006; Schenk et al., 1994) δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως, αν οι ΔΜΟ ενεργοποιούν τις IKKs ή άλλες κινάσες που φωσφορυλιώνουν τον IκB. Ωστόσο σε μια μελέτη της ερευνητικής ομάδας του Hirata, διαπιστώθηκε ότι το H_2O_2 προκάλεσε την άμεση φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του IKK συμπλόκου σε δύο κατάλοιπα σερίνης (Kamata et al., 2002).

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν αναφορές που δείχνουν ότι αλλαγές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά και να αναστείλουν την ενεργοποίηση του NF-κB στο κυτταρόπλασμα (Karahi et al., 2000; Korn et al., 2001; Pantano et al., 2006; Reynaert et al., 2004; Rossi et al., 2000; Roussel and Barchowsky, 2000). Παραδείγματος χάριν, η έκθεση κυττάρων σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες ή ακόμη και η άμεση προσθήκη H_2O_2 σε καλλιέργειες κυττάρων έχει αναφερθεί ότι προκαλούν την οξείδωση και απενεργοποίηση του συμπλόκου της IKK κινάσης (Jaspers et al., 2001; Korn et al., 2001; Rossi et al., 2000; Roussel and Barchowsky, 2000). Πιο συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί ότι η IKKβ υπομονάδα του IKK συμπλόκου που περιέχει στο ενεργό της κέντρο ένα κατάλοιπο κυστεΐνης (Cys 179) είναι πιθανόν να χάνει τη δραστηριότητά της, μέσω οξείδωσής της από το H_2O_2 , με αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργοποίησης και της

μετατόπισης του NF-κB στον πυρήνα (Karahi et al., 2000; Rossi et al., 2000). Επιπλέον, εκτός από την IKK κινάση που έχειδειχθεί ότι αποτελεί στόχο οξειδωσης από την δράση του H₂O₂, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η MEKK1, μια ανοδική κινάση του IKK συμπλόκου ((Lee et al., 1998a; Nemoto et al., 1998), σε συνθήκες οξειδωτικού στρες απενεργοποιείται. Ειδικότερα, η έκθεση κυττάρων σε H₂O₂ διαπιστώθηκε ότι προκάλεσε την γλουταθειονυλίωση μιας κυστεΐνης (Cys1238) στο ενεργό κέντρο της MEKK1 με αποτέλεσμα την πλήρη αναστολή της δραστηριότητάς της (Cross and Templeton, 2004). Αν και δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί, πιστεύεται ότι η απενεργοποίηση της MEKK1, αποτελεί σημείο κλειδί στο τρόπο μέσω του οποίου αναστέλλεται η ενεργοποίηση του NF-κB σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Συμπερασματικά, αν και υπάρχει πληθώρα ερευνητικών μελετών σχετικά με το ρόλο του H₂O₂ στο μηχανισμό ενεργοποίησης του NF-κB, τα δεδομένα μερικές φορές φαίνεται ότι είναι αντιφατικά. Η αντιφατικότητα αυτή ίσως να οφείλεται στα διαφορετικά είδη κυττάρων, στις διαφορετικές συγκεντρώσεις οξειδωτικών και στους διαφορετικούς χρόνους επώασης. Εντούτοις, σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις το H₂O₂ φαίνεται ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στο μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB καθώς αλλαγές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία μπορούν να επηρεάσουν την ενεργοποίησή του είτε θετικά είτε αρνητικά (Pantano et al., 2006).

1.4.2 TNF-α

Άλλο παράδειγμα που τεκμηριώνει την εμπλοκή του H₂O₂ σε πορείες μεταγωγής σημάτων αποτελεί το μονοπάτι του TNF-α. Έχει διαπιστωθεί ότι η διέγερση κυττάρων με TNF-α προκαλεί την απότομη αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης H₂O₂, ενώ η απομάκρυνση των δημιουργούμενων ΔΜΟ με τη χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών προστατεύει τα κύτταρα από τον κυτταρικό θάνατο (Kamata et al., 2005; Pham et al., 2004; Sakon et al., 2003). Πρόσφατες πειραματικές μελέτες, στο παραπάνω μοντέλο, αποδίδουν τη δράση των ΔΜΟ στην ικανότητά τους να απενεργοποιούν μέσω οξειδωσης, την ενζυμική δραστηριότητα τυροσινικών φωσφατασών που εμπλέκονται σε αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εργασία του Michael Karin και συνεργατών, η οποία τεκμηριώνει ότι η έκθεση κυττάρων σε TNF-α (μέσω παροδικής αύξησης της συγκέντρωσης H₂O₂) προκαλεί την οξείδωση και απενεργοποίηση των τυροσινικών

φωσφατασών διπλής εξειδίκευσης της JNK (Davis, 2000), η ενεργοποίηση της οποίας αποτελεί κεντρικό βήμα στη σηματοδοτική πορεία από τον TNF- α (Deng et al., 2003) οδηγώντας στην παρατεταμένη φωσφορυλίωση της και τελικά την πρόκληση αποπτωτικού θανάτου (Kamata et al., 2005). Επιπρόσθετα, έχει διαπιστωθεί ότι στο μονοπάτι του TNF- α , οι ΔΜΟ μπορούν να επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση και άλλων μορίων. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η θειορεδοξίνη (Trx) που αποτελεί έναν από τους βασικότερους αναστολείς της κινάσης ASK1 (Apoptosis Signal Regulating Kinase-1) (Saitoh et al., 1998). Διάφοροι στρεσογόνοι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίησή της, μεταξύ άλλων και η έκθεση κυττάρων σε TNF- α (Gotoh and Cooper, 1998). Η ενεργοποίηση της ASK1 αποτελεί καθοριστικό βήμα στην αποπτωτική διαδικασία των κυττάρων, καθώς η αποσιώπηση του γονιδίου της ASK1, έχει δείχθει ότι αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο (Matsuzawa et al., 2002; Tobiume et al., 2001) και αντίστοιχα η υπερέκφραση ή η συνεχής ενεργοποίησή της οδηγεί στον αποπτωτικό θάνατο (Hatai et al., 2000; Kanamoto et al., 2000) Από μελέτες της ερευνητικής ομάδας του Ichijo στην Ιαπωνία, διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του H₂O₂, μέσω διέγερσης των κυττάρων με TNF- α , προκάλεσε την οξείδωση και απομάκρυνση της Trx (η οποία στο ενεργό της κέντρο έχει δυο οξειδοαναγωγικά ευαίσθητα κατάλοιπα κυστεϊνης Cys 32, Cys 35) από το σύμπλοκο της ASK1 (Liu et al., 2000; Noguchi et al., 2005) με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή της και τελικά την πρόκληση αποπτωτικού θανάτου (Liu et al., 2000; Noguchi et al., 2005).

1.4.3 Akt (Κινάση Κυτταρικής Επιβίωσης)

Μια άλλη πρωτεΐνη, η κινάση κυτταρικής επιβίωσης Akt (πρωτεϊνική κινάση B) που εμπλέκεται στη μετάδοση αντι-αποπτωτικών σημάτων έχει βρεθεί ότι επηρεάζεται από αλλαγές στην ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία (Scheid and Woodgett, 2001). Έχει αναφερθεί ότι έκθεση κυττάρων σε H₂O₂ προκάλεσε την δημιουργία ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού στο μόριο της Akt (Cys 297, Cys 311), με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή της και τελικά το θάνατο των κυττάρων (Murata et al., 2003) Η υπερέκφραση όμως της γλουταρεδοξίνης (GRX) στα κύτταρα αυτά, προστάτευσε από την απενεργοποίησή της με αποτέλεσμα την αναστολή του αποπτωτικού θανάτου τους.

1.4.4 Τυροσινικές κινάσες

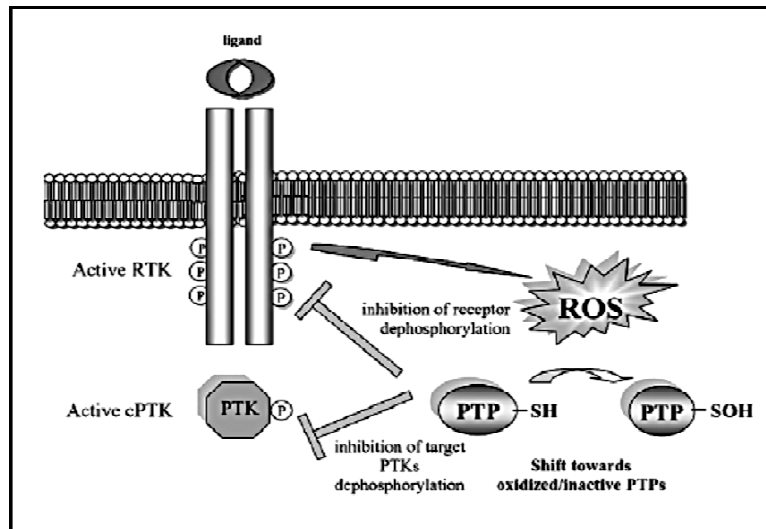
Υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που αποδεικνύουν ότι το H_2O_2 μπορεί να επηρεάσει επίσης την οξειδοαναγωγική κατάσταση τυροσινικών κινασών. Επι παραδείγματι, άμεση οξείδωση τυροσινικών κινασών έχει αναφερθεί για τον υποδοχέα της ινσουλίνης (Insulin, receptor kinase, IRK) (Schmid et al., 1998; Schmid et al., 1999) για τον υποδοχέα του EGF και του PDGF (Esposito et al., 2003; Lee et al., 2004b) για τη διαμεμβρανική τυροσινική κινάση Ret (Kato et al., 2000) και τέλος για την Src κινάση (Akhand et al., 1999; Senga et al., 2000). Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, η οξείδωση αυτών των κινασών, από την δράση του H_2O_2 , οδήγησε στην ενίσχυση της ενζυμικής τους δραστηριότητας με αποτέλεσμα την υπερενεργοποίηση τους και την έντονη επαγωγή του εκάστοτε σήματος.

1.4.5 Τυροσινικές φωσφατάσες

Μια από τις πιο χαρακτηριστικές κατηγορίες μορίων που η δράση τους επηρεάζεται από αλλαγές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία είναι η οικογένεια των πρωτεϊνικών τυροσινικών φωσφατασών (Protein Tyrosine Phosphatases, PTPs). Το ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτών χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μιας περιοχής που αποτελείται από μια κυστεΐνη και μία αργινίνη ανάμεσα στις οποίες παρεμβάλλονται πέντε αμινοξέα (**Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Arg**) (Denu and Dixon, 1998) η οποία συχνά αναφέρεται και ως μοτίβο C(X)₅R. Το περιβάλλον αυτό ευνοεί την αποπρωτονίωση της σουλφυδρυλικής ομάδας της κυστεΐνης αυτής (pKa=4,7-5,4) καθιστώντας την ευάλωτη στην οξείδωση από το H_2O_2 (βλέπε σελ. 20).

Για πρώτη φορά το 1998 ο Rhee S.G και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι η δέσμευση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) στον υποδοχέα του σε κύτταρα A431, προκάλεσε απότομη αύξηση στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση H_2O_2 , με αποτέλεσμα την οξείδωση και απενεργοποίηση της PTP1B φωσφατάσης (Lee et al., 1998b). Επίσης σε μία άλλη ερευνητική εργασία, αποδείχθηκε ότι η έκθεση κυττάρων σε PDGF, μέσω αύξησης της συγκέντρωσης H_2O_2 , προκάλεσε την οξείδωση και απενεργοποίηση της LMW φωσφατάσης (Low-molecular Proteins-PTP) (Caselli et al., 1998; Chiarugi et al., 2001). Βέβαια στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί ότι και στα δύο παραπάνω παραδείγματα οι φωσφατάσες αυτές

επανάκτησαν μετά από κάποια χρονική στιγμή την ενεργότητα τους (αντιστρεπτή οξείδωση), μέσω της δράσης ενδογενών αναγωγικών παραγόντων. Αντίστοιχα πολλές άλλες τυροσινικές φωσφατάσες όπως χαρακτηριστικά είναι η Cdc25C (Savitsky and Finkel, 2002), το PTEN (Lee et al., 2002) και η SHP-2 (Meng et al., 2002) έχει διαπιστωθεί ότι αποτελούν στόχους οξείδωσης από το H_2O_2 .



Εικόνα 4: Η οξείδωση τυροσινικών φωσφατασών από την δράση των ΔΜΟ διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην μεταγωγή ενδοκυττάρων σημάτων (Chiarugi and Buricchi, 2007)

Η οξείδωση τυροσινικών φωσφατασών φαίνεται ότι αποτελεί σημείο κλειδί στην μεταγωγή ενδοκυττάρων σημάτων (Εικόνα 4). Η ιδέα που υποστηρίζεται είναι ότι η παροδική απενεργοποίηση τυροσινικών φωσφατασών μέσω οξείδωσης τους από τις ΔΜΟ, που παράγονται μετά τη δέσμευση προσδεμάτων σε υποδοχείς κινασών τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases, RTKs) αντιπροσωπεύει τη βασική στρατηγική που έχουν υιοθετήσει τα κύτταρα σε πορείες μεταγωγής σημάτων καθώς η αναστολή της δράσης τους οδηγεί στην ενεργοποίηση των αντίστοιχων τυροσινικών κινασών. Η επαναφορά εν συνεχεία της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας μέσω της δράσης αναγωγικών ενζύμων, μπορεί να οδηγήσει στην ανάκτηση της ενζυμικής δραστηριότητας των τυροσινικών φωσφατασών και στον τερματισμό του εκάστοτε σήματος. (Chiarugi and Buricchi, 2007). Με άλλα λόγια, η οξείδωση/ απενεργοποίηση PTPs από την δράση του H_2O_2 , υποστηρίζεται ότι διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην ρύθμιση της δράσης των PTKs και κατ' επέκταση στη μετάδοση του σήματος.

1.4.6 Οξείδωση σουλφιδρυλικών ομάδων

Όλα τα προηγούμενα παραδείγματα έχουν ως κοινό παρανομαστή την οξείδωση ευαίσθητων κυστεϊνικών καταλοίπων. Σύμφωνα με την επικρατέστερη θεωρία η δράση του H_2O_2 ως σηματοδοτικό μόριο σχετίζεται με την οξείδωση ευαίσθητων σουλφιδρυλικών ομάδων σε κυστεϊνικά κατάλοιπα μορίων που διαδραματίζουν κομβικό ρόλο σε πορείες μεταγωγής σημάτων. Παρόλο που οι περισσότερες πρωτεΐνες περιέχουν αρκετά κατάλοιπα κυστεϊνών στο μόριο τους, το H_2O_2 δεν έχει την ικανότητα να οξειδώνει οποιαδήποτε από αυτές αλλά δρα επιλεκτικά μόνο σε ορισμένες από αυτές. Η παρουσία θετικά φορτισμένων αμινοξέων στο μικροπεριβάλλον της κυστεϊνης όπως για παράδειγμα καταλοίπων αργινίνης, λυσίνης και ιστιδίνης έχει πρωτεύουσα σημασία στο αν μια κυστεϊνη θα οξειδωθεί. Το pK_a , δηλαδή η σταθερά διάστασης, των περισσότερων κυστεϊνών μιας πρωτεΐνης είναι περίπου 8.5 και κατά συνέπεια σε φυσιολογικό pH (περίπου 7.4) η σουλφιδρυλική τους ομάδα είναι πρωτονιωμένη. Στην περίπτωση όμως που μία κυστεϊνη περιβάλλεται από θετικά φορτισμένα αμινοξέα, το pK_a της σουλφιδρυλικής αυτής ομάδας μειώνεται, με συνέπεια σε φυσιολογικό pH η ομάδα αυτή να αποπρωτονιώνεται (αρνητικά φορτισμένη) (Lohse et al., 1997; Zhang and Dixon, 1993). Στην περίπτωση αυτή πιστεύεται ότι η συγκεκριμένη κυστεϊνη είναι ευάλωτη στην οξειδωτική δράση του H_2O_2 .

Συγκεντρωτικά κλείνοντας αυτή την ενότητα, θα πρέπει να τονιστεί ότι αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση κεντρικών σηματοδοτικών μορίων μέσω οξείδωσης τους από το H_2O_2 , διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην τελική απόκριση των κυττάρων σε πορείες μεταγωγής σημάτων και συσχετίζονται άμεσα με όλες τις κυτταρικές διεργασίες. Μολονότι υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία η οποία επικεντρώνεται στο ρόλο και στις συνέπειες που επιφέρουν οι οξειδωτικές τροποποιήσεις κυστεϊνικών καταλοίπων στη μεταβίβαση μηνυμάτων από το H_2O_2 , οι ακριβείς μηχανισμοί μέσω των οποίων πραγματοποιούνται οι τροποποιήσεις αυτών των σουλφιδρυλικών ομάδων παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι.

1.5 Οξειδωτικό Στρες και Απόπτωση

Η ανακάλυψη ότι ο κυτταρικός θάνατος είναι μία διαδικασία η οποία ελέγχεται βιοχημικά και είναι τόσο πολύπλοκη όσο άλλες σημαντικές βιολογικές διαδικασίες έχει προκαλέσει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον. Οι Wyllie και Kerr διαπίστωσαν το 1970, την ύπαρξη ενός τύπου κυτταρικού θανάτου, διακριτού από τη νέκρωση, τον οποίο ονόμασαν απόπτωση. Έτσι, ενώ η νέκρωση είναι αποτέλεσμα οξείας κυτταρικής βλάβης και αποτελεί παθητική διαδικασία, η απόπτωση πραγματοποιείται από ένα γενετικά καθορισμένο πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου και είναι ενεργητική διαδικασία. Επιπλέον, σε αντίθεση με τη μορφολογία των νεκρωτικών κυττάρων η οποία χαρακτηρίζεται από διόγκωση, διάρρηξη της πλασματικής μεμβράνης και έκχυση των κυτταρικών συστατικών τους στο εξωκυττάριο περιβάλλον, η αποπτωτική διαδικασία διακρίνεται από κυτταρική συρρίκνωση και εξωτερίκευση ενός συστατικού της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, της φωσφατιδυλοσερίνης προς τον εξωκυττάριο χώρο. Επίσης, στον πυρήνα πραγματοποιείται συμπύκνωση της χρωματίνης καθώς και πρόκληση ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων με αποτέλεσμα την θραυσματοποίηση του DNA σε κλάσματα πολλαπλάσια των 180 ζευγών βάσεων. Ο κατακερματισμένος πυρήνας και τα κυτταροπλασματικά κατάλοιπα σχηματίζουν κυστίδια που περιβάλλονται από μεμβράνη, τα οποία καλούνται αποπτωτικά σωματίδια (apoptotic bodies). Τα αποπτωτικά αυτά σωματίδια, κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, απομακρύνονται από γειτονικά υγιή κύτταρα ή φαγοκύτταρα, χωρίς να υπάρχει κίνδυνος για τους υπόλοιπους υγιείς ιστούς του οργανισμού (Martin et al., 1995; Vermes et al., 1995) ενώ αντίθετα στην νέκρωση, η έκχυση κυτταρικών συστατικών στο μεσοκυττάριο περιβάλλον προκαλεί φλεγμονή με περαιτέρω βλάβη στους ιστούς.

1.6 Φυσιολογική σημασία της απόπτωσης

Ο φυσιολογικός ρόλος της απόπτωσης, τόσο στην ανάπτυξη του οργανισμού όσο και στην ενήλικη ζωή του, αποτελεί αντικείμενο εντατικής ερευνητικής δραστηριότητας. Φαίνεται πως η επιλεκτική κυτταρική «αυτοκτονία» είναι ένα γεγονός κεντρικής σημασίας για τη μορφοποίηση του εμβρύου, τον τερματισμό ανοσολογικών αποκρίσεων, τον περιορισμό εξάπλωσης των μολύνσεων και γενικά

για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιοστασίας στους ιστούς (Jacobson et al., 1997; Meier et al., 2000; Vaux and Korsmeyer, 1999). Η επιβίωση ενός πολυκύτταρου οργανισμού εξαρτάται από τη διατήρηση και την ανανέωση των κυττάρων διαφορετικών ιστών, μια διεργασία που ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ του πολλαπλασιασμού και της απομάκρυνσης των κυττάρων με τη διαδικασία της απόπτωσης. Απορρύθμιση της απόπτωσης δύναται να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από απώλεια κυττάρων, όταν τα επίπεδα της απόπτωσης είναι αυξημένα ή συσσώρευση των ανεπιθύμητων κυττάρων, όταν τα επίπεδα της απόπτωσης είναι ανεπαρκή. Στην περίπτωση των λεμφοκυττάρων για παράδειγμα, αυξημένη απόπτωση μπορεί να οδηγήσει σε ανοσοκαταστολή, όπως συμβαίνει στο σύνδρομο AIDS. Η αυξημένη απόπτωση, επίσης, έχει θεωρηθεί υπεύθυνη για την πρόκληση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η νόσος του Αλτς/χάιμερ, η νόσος του Πάρκινσον και η σκλήρυνση κατά πλάκας (Hass, 2003), ενώ τέλος, η παρεμπόδιση της αποπτωτικής διαδικασίας μπορεί να κριθεί ως σημαντική για την ανάπτυξη όγκων και την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων (Thompson, 1995).

1.7 Μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης

1.7.1 Ο καταρράκτης των κασπασών

Η διαδικασία της απόπτωσης προκαλείται από μια σειρά σημάτων, που ενεργοποιούνται ως απόκριση των κυττάρων σε διάφορα εξωτερικά ερεθίσματα. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα σήματα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών, ο οποίος αποτελεί το τελικό στάδιο της εκτέλεσης της απόπτωσης. Οι κασπάσες αποτελούν μια οικογένεια πρωτεασών με υψηλή ομολογία και είναι όλες κυστεϊνικές πρωτεάσες εξειδικευμένες να υδρολύουν πεπτίδια σε σημεία που υπάρχουν κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος, ενώ περιέχουν μια συντηρημένη ενεργή αλληλουχία πέντε αμινοξέων Gln-Ala-Cys-X-Gly (το X μπορεί να είναι R, Q ή D). Πριν την ενεργοποίησή τους βρίσκονται με τη μορφή ζυμογόνων, τα οποία ονομάζονται προκασπάσες. Η ενεργοποίηση των προκασπασών περιλαμβάνει πρωτεολυτική σχάση στο καρβοξυτελικό άκρο συγκεκριμένων καταλοίπων ασπαρτικού οξέος, που ακολουθείται συνήθως από την απομάκρυνση της

προπεριοχής από την ίδια την κασπάση. Οι ενεργές κασπάσες είναι τετραμερή, που αποτελούνται από δύο ταυτόσημα ετεροδιμερή μεγάλης/μικρής υπομονάδας (Liang and Fesik, 1997).

Οι κασπάσες διαιρούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη δομική ομολογία τους. Στους ενεργοποιητές της απόπτωσης, που είναι οι κασπάσες -2, -8, -9 και -10 (εναρκτήριοι κασπάσες), στους εκτελεστές της απόπτωσης, που είναι οι κασπάσες -3, -6 και -7 (εκτελεστικές κασπάσες), και στους μεσολαβητές της φλεγμονής, που είναι οι κασπάσες -1, -4, -5, -11, -12, -13 και -14. Οι ενεργοποιητές της απόπτωσης έχουν ιδιαίτερα μεγάλες προπεριοχές, οι οποίες περιέχουν την περιοχή DED που συνεπάγεται το θάνατο (death effector domain, DED) στις προκασπάσες -8 και -10, ή την περιοχή στρατολόγησης των κασπασών (caspase recruitment domain, CARD) στις προκασπάσες -2 και -9. Οι περιοχές DED και CARD εμπλέκονται στη ρύθμιση των κασπασών μέσω μηχανισμών αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

1.7.2 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων

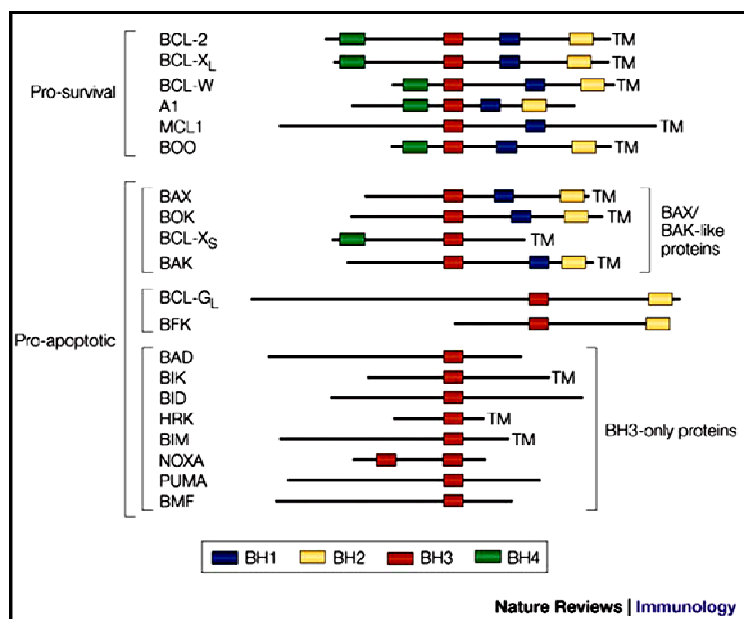
Τα μιτοχόνδρια αποτελούν το σημείο στο οποίο συγκλίνουν τα περισσότερα ερεθίσματα που προκαλούν απόπτωση, συμπεριλαμβανομένου και του H_2O_2 , αποτελώντας την κύρια οδό μέσω της οποίας ενεργοποιείται ο καταρράκτης των κασπασών. Έτσι, όταν υπάρχει κάποιο αποπτωτικό ερέθισμα, επηρεάζονται τα μιτοχόνδρια και προκαλείται διάνοιξη πόρων διαπερατότητας στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Mitochondrion Permeability Transition Pores, MPTPs). Άμεσο αποτέλεσμα είναι η αλλαγή της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Κατά τη φάση αυτή παρατηρείται συνήθως απώλεια του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων ($\Delta\Psi_m$), διόγκωση της μιτοχονδριακής μήτρας, διακοπή του αερόβιου μεταβολισμού και αύξηση της συγκέντρωσης των ΔΜΟ.

Επακόλουθο της αποσταθεροποίησης της μιτοχονδριακής μεμβράνης είναι η απελευθέρωση αποπτωτικών πρωτεϊνών που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι αυστηρά περιορισμένες στο μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο. Μια από αυτές τις πρωτεΐνες είναι το κυτόχρωμα C (cyt-C). Το κυτόχρωμα C είναι μια πρωτεΐνη 12.5 kDa, που βρίσκεται ανάμεσα στα σύμπλοκα III (UQH₂-αναγωγή του κυτοχρώματος C) και IV (οξειδάση του κυτοχρώματος C) της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Είναι συνδεδεμένο με ηλεκτροστατικές δυνάμεις στην

εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και έχει φυσιολογικό ρόλο ανεξάρτητο από την αποπτωτική του δράση. Μετά την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα, το κυτόχρωμα C παίρνει μέρος στο σχηματισμό ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου θανάτου που καλείται αποπτώσωμα. Το αποπτώσωμα αποτελείται από τον κυτταροπλασματικό παράγοντα Araf-1 (apoptotic-protease activating factor), από το κυτόχρωμα C και από την προκασπάση-9, ενώ ο σχηματισμός του εξαρτάται από την παρουσία ATP. Τόσο το αμινοτελικό άκρο του παράγοντα Araf-1 όσο και η προπεριοχή της προκασπάσης-9 περιέχουν τις περιοχές στρατολόγησης των κασπασών CARDs, οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και έχουν σαν αποτέλεσμα την αυτοενεργοποίηση της προκασπάσης-9. Η ενεργοποιημένη κασπάση-9, με την σειρά της σχάζει τις εκτελεστικές προκασπάσες -3, -6 και -7, ενώ η ενεργή κασπάση-3 μπορεί να λειτουργήσει ενισχυτικά στην ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 μέσω ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης του φαινομένου (Jiang and Wang, 2000).

1.7.3 Η οικογένεια ογκοπρωτεϊνών Bcl-2

Κεντρικό ρόλο στον έλεγχο της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών μεμβρανών διαδραματίζουν τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από αντι-αποπτωτικά μέλη που εμποδίζουν την αύξηση της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών μεμβρανών καθώς και από προ-αποπτωτικά μέλη που επάγουν την MMP όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 5 (Youle and Strasser, 2008). Ο ρόλος και η δράση αυτών των πρωτεϊνών, κατ' επέκταση διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο κατά ποσό το κύτταρο θα επιβιώσει ή θα οδηγηθεί σε αποπτωτικό θάνατο. Στα θηλαστικά έχουν χαρακτηριστεί 25 συγγενείς πρωτεΐνες, οι οποίες μοιράζονται τουλάχιστον μία συντηρημένη Bcl-2 ομόλογη περιοχή (BH). Τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών μπορεί να εμπεριέχουν έως και 4 συντηρημένες ομόλογες περιοχές (BH), οι οποίες χαρακτηρίζονται ως BH1, BH2, BH3 και BH4 (Εικόνα 5)(Cory and Adams, 2002; Youle and Strasser, 2008).



Εικόνα 5: Τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών (Cory and Adams, 2002)

1.7.3.1 Αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2

Ο ρόλος των αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών είναι να συντελλούν στην σταθεροποίηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική πλευρά μεμβρανών, όπως η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, το ενδοπλασματικό δίκτυο και η μεμβράνη του πυρηνικού φακέλου, όπου συνδέονται με τη βοήθεια του υδρόφοβου καρβοξυτελικού τους άκρου. Τα πιο αντιπροσωπευτικά αντιαποπτωτικά μέλη είναι η Bcl-2 και η Bcl-X_L (Muchmore et al., 1996; Petros et al., 2001) Οι δύο αυτές πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να ετεροδιμερίζονται με τα προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2, αναστέλλοντας έτσι τον ολιγομερισμό τους και τη ικανότητα τους να εμποδίζουν τη διάνοιξη πόρων στα μιτοχόνδρια.

1.7.3.2 Προαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2

BH3- only πρωτεΐνες

Οι BH3-only πρωτεΐνες περιέχουν μόνο την περιοχή BH3 και μπορούν να εκκινήσουν την αποπτωτική διαδικασία ως απόκριση σε κάποια ενδοκυττάρια βλάβη. Παρά την προαποπτωτική τους δράση, οι BH3-only πρωτεΐνες δεν μπορούν να

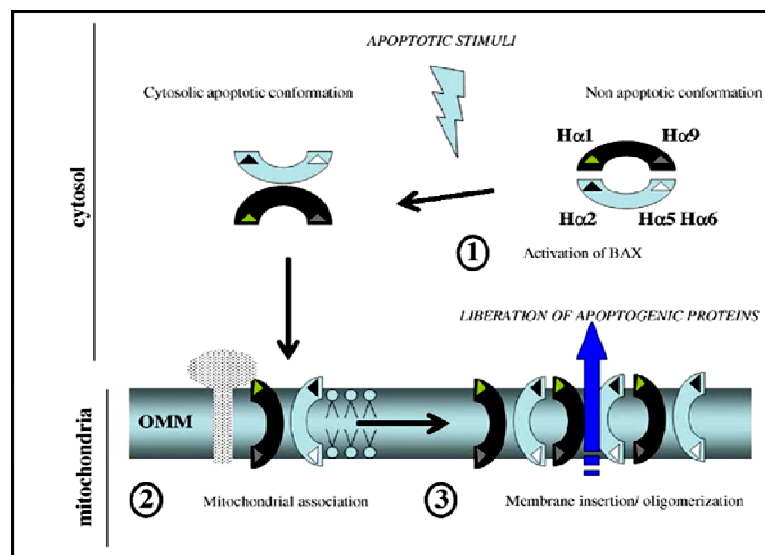
προκαλέσουν απόπτωση, όταν απουσιάζουν είτε η Bax είτε η Bak (Cheng et al., 2001; Zong et al., 2001)

Μια από τις πιο καλά μελετημένες BH3-only πρωτεΐνες είναι η πρωτεΐνη Bid (McDonnell et al., 1999), η οποία βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σαν ανενεργό ζυμογόνο και ενεργοποιείται μέσω σχάσης από την κασπάση-8 (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Η πρωτεΐνη Bid σχάζεται και προκύπτει το tBid (truncated Bid) στα 15 kDa, το οποίο μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια και αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Bax και Bak προωθώντας την προαποπτωτική τους δράση (Madesh et al., 2002; Wei et al., 2000).

Εκτός από tBid, η πρωτεΐνη Bid μπορεί να σχάσει και σε ένα άλλο κομμάτι στα 20 kDa, το οποίο πρόσφατα αναγνωρίστηκε ως αποτέλεσμα της σχάσης του Bid, που προκαλείται μετά από την ενεργοποίηση της MAP κινάσης, JNK από τον TNF- α , και ονομάζεται jun-Bid (jBid). (Deng et al., 2003). Το jBid μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια όπου ενισχύει στη διάνοιξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης, προκαλώντας την απελευθέρωση του αποπτωτικού παράγοντα Smac/DIABLO, αλλά όχι του κυτοχρώματος C.

Bax-like πρωτεΐνες

Από τις πρωτεΐνες αυτής της υποομάδας η Bax και η Bak είναι οι πιο διαδεδομένες. Τόσο η Bax όσο και η Bak θεωρείται ότι λειτουργούν κυρίως στα μιτοχόνδρια, ενώ αρκετό ενδιαφέρον εμφανίζει η δράση τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ειδικότερα για την πρωτεΐνη Bax είναι γνωστό ότι, ενώ σε ανέπαφα κύτταρα βρίσκεται υπό την μορφή κυτταροπλασματικού μονομερούς, όταν δεχθεί κάποιο αποπτωτικό ερέθισμα αλλάζει διαμόρφωση, εισέρχεται στην εξωτερική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ολιγομερίζεται (Antonsson et al., 2001; Hsu and Youle, 1998; Mikhailov et al., 2001) και με τον τρόπο αυτό ενισχύει στη διάνοιξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης, όπως χαρακτηριστικά απεικονίζεται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6: Μηχανισμός ενεργοποίησης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax (Er et al., 2006)

Αν και ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης και μετατόπισης της πρωτεΐνης Bax, από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί, η επικρατούσα άποψη είναι ότι η οικογένεια των MAP κινασών και πιο συγκεκριμένα οι κινάσες JNK και p38 φωσφορυλιώνοντας ένα κατάλοιπο θρεονίνης (Thr165) στην αμινοτελική περιοχή της Bax, προκαλούν την ενεργοποίηση και την άμεση μετατόπιση της πρωτεΐνης από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια (Kim et al., 2006).

1.8 Η οικογένεια των MAPK

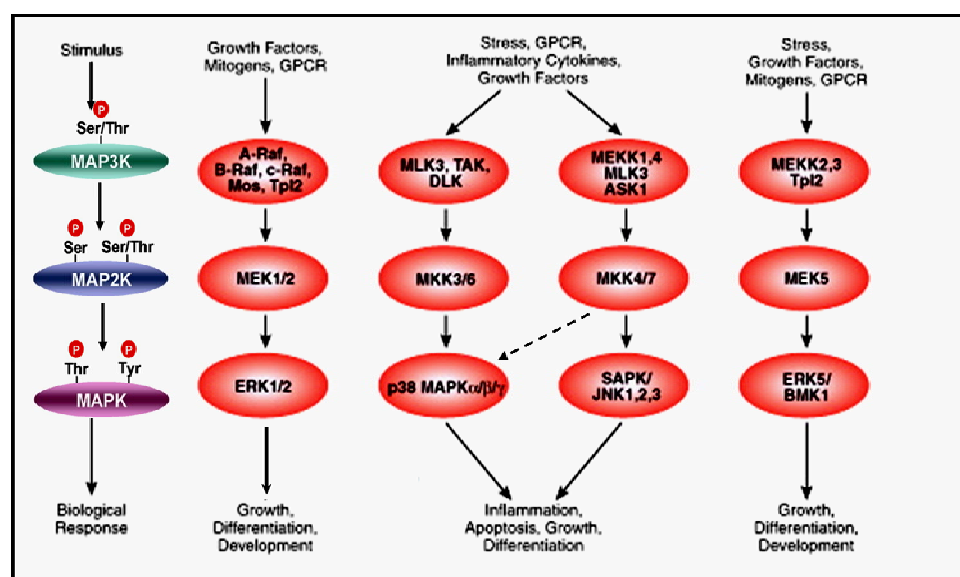
Οι MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) συνθέτουν μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών που διαδραματίζουν κομβικό ρόλο σε μονοπάτια μεταγωγής διαφόρων σημάτων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που οδηγούν στην απόπτωση. Οι MAPKs φωσφορυλιώνοντας ειδικά κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης σε πρωτεΐνες-στόχους, έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν στη ρύθμιση βασικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η γονιδιακή έκφραση, ο μεταβολισμός, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος κ.ά (Chang and Karin, 2001). Η φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων των MAPKs λειτουργεί ως διακόπτης διεγείροντας ή καταστέλλοντας τη δραστηριότητα των καθοδικών πρωτεϊνών- στόχων

τους. Παράλληλα το επίπεδο φωσφορυλίωσης και κατ' επέκταση η δραστηριότητα τους ρυθμίζεται / ελέγχεται από συγκεκριμένες πρωτεϊνικές φωσφατάσες, τις MKPs, (MAP kinase phosphatases), οι οποίες τις αποφωσφορυλιώνουν (Patterson et al., 2009). Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι MAPKs μπορούν επίσης να αποφωσφορυλιωθούν είτε από φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης, είτε από τυροσινικές φωσφατάσες. Γίνεται επομένως κατανοητό, ότι η διάρκεια και η ένταση φωσφορυλίωσης των MAPKs επηρεάζεται καθοριστικά από τη δράση των αντίστοιχων φωσφατασών τους.

Οι MAPKs αποτελούν μέρος ενός καταρράκτη που ενεργοποιείται από διάφορα ερεθίσματα και περιλαμβάνει τρία διαδοχικά βήματα ενεργοποίησης (Εικόνα 7). Πιο συγκεκριμένα, οι MAPKs, φωσφορυλιώνονται από τις MAP2K (Mitogen Activated Kinases Kinases), οι οποίες με την σειρά τους φωσφορυλιώνονται από τις MAP3K, που αποτελούν την τρίτη συνιστώσα του σηματοδοτικού καταρράκτη όπως χαρακτηριστικά απεικονίζεται στην Εικόνα 7.

Στα θηλαστικά, οι MAP κινάσες διαχωρίζονται σε τέσσερις βασικές υποοικογένειες ως εξής (Pearson et al., 2001) :

1. Κινάσες ρυθμιζόμενες από εξωκυττάρια σήματα (ERK 1/2, Extracellular signal Regulated Kinases),
2. c-Jun N-terminal Kinases (JNK1,JNK2,JNK3)
3. p38 κινάσες (p38α, p38β, p38γ και p38δ)
4. ERK5 ή αλλιώς (BMK1, big MAPK 1).



Εικόνα 7: Υπερ-οικογένεια MAP κινασών (www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp)

Για την πλήρη ενεργοποίηση των MAPK απαιτείται η διπλή φωσφορυλίωση σε δύο συντηρημένα κατάλοιπα θρεονίνης (Thr) και τυροσίνης (Tyr) που χωρίζονται από ένα μόνο αμινοξύ, ορίζοντας ένα τριπεπτιδικό μοτίβο, Thr-X-Tyr. Για παράδειγμα, η JNK παρουσιάζει το μοτίβο Thr-Pro-Tyr, ενώ στην p38 παρεμβάλλεται γλυκίνη (Gly). Η ικανότητα των MAP2Ks να αναγνωρίζουν διαφορετικές MAPKs εξαρτάται εν μέρει από αυτό το τριπεπτιδικό μοτίβο, συνεισφέροντας στην εξειδίκευση των μηχανισμών με τους οποίους ενεργοποιούνται οι MAPKs (Pearson et al., 2001). Γενικότερα όμως στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι η αποτελεσματικότητα και η ειδικότητα αλληλεπίδρασης των MAPKs με τα αντίστοιχα υποστρώματά τους, τις φωσφατάσες τους και τις ανοδικές κινάσες τους, ρυθμίζεται από την ύπαρξη ενός τμήματος που εντοπίζεται εκτός του καταλυτικού κέντρου των MAPKs, γνωστό ως «Common Docking Domain» Έτσι, μέσω αυτού του τμήματος, διασφαλίζονται σταθερές και εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις (Tanoue and Nishida, 2003).

Οι MAPKs ενεργοποιούνται από πληθώρα διεγερτών συμπεριλαμβανομένων και του H₂O₂. Ειδικότερα οι κινάσες p38 και JNK, οι οποίες αναφέρονται και ως SAPKs (Stress-Activator Protein Kinases) θεωρείται ότι ανταποκρίνονται κυρίως σε στρεσογόνες καταστάσεις (Matsuzawa and Ichijo, 2005) ενώ οι ERKs ενεργοποιούνται κυρίως από αυξητικούς παράγοντες. Βέβαια θα πρέπει να επισημανθεί ότι παρόλο που η δράση των ERK1/2 έχει συσχετιστεί επί το πλείστον με την ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τη διαφοροποίηση ενώ οι JNKs και οι p38s κινάσες με την πρόκληση απόπτωσης, την διακοπή του κυτταρικού κύκλου και γενικότερα τον κυτταρικό θάνατο, πολλοί επιστήμονες στο πεδίο αυτό θεωρούν ότι αυτή η κατηγοριοποίηση είναι υπεραπλουστευμένη, προτείνοντας την άποψη ότι η δράση των MAP κινασών μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το είδος του κυττάρου και το εκάστοτε ερέθισμα (Chang and Karin, 2001).

1.8.1 c-Jun N-terminal Kinases (JNK)

Υπάρχουν τρία μέλη στην οικογένεια των JNKs πρωτεϊνικών κινασών, η JNK1, JNK2 και η JNK3 (Johnson and Nakamura, 2007). Οι δύο πρώτες εκφράζονται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα και τους ιστούς σε αντίθεση με την JNK3 που ανιχνεύεται κυρίως στον εγκέφαλο και λιγότερο στην καρδιά και τους όρχεις. Ο ρόλος τους

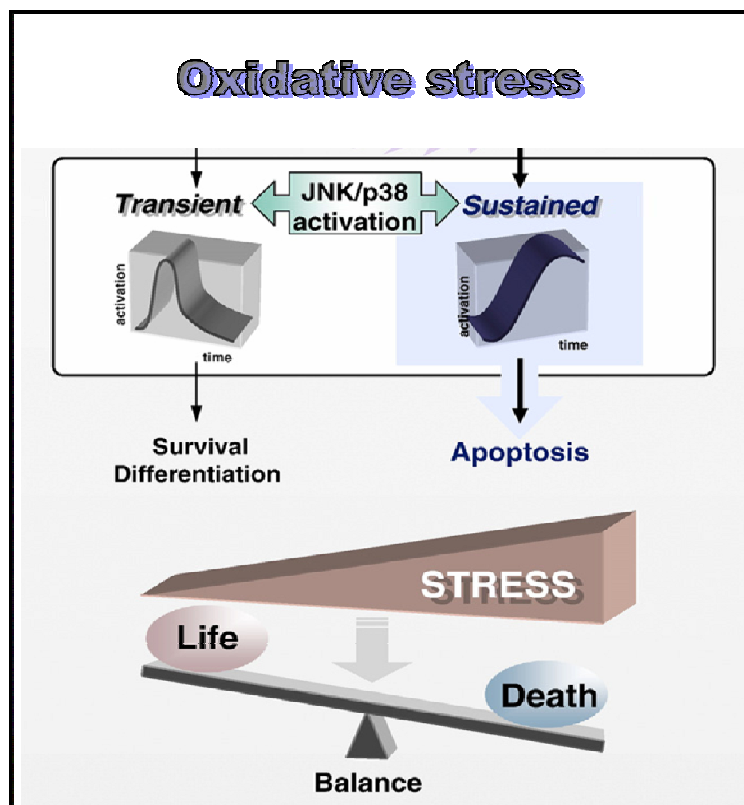
περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1991 από την ερευνητική ομάδα του Pulverer, η οποία διαπίστωσε ότι η JNK κινάση είναι υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης c-Jun (μέρος του AP-1 μεταγραφικού παράγοντα) σε δύο κατάλοιπα σερίνης (Ser-63,-73), ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο τη μεταγραφή πληθώρας γονιδίων (Pulverer et al., 1991). Σήμερα είναι ευρέως γνωστό ότι οι JNKs ενεργοποιούνται από διάφορες στρεσογόνες καταστάσεις όπως είναι το οξειδωτικός στρες, η ιονίζουσα ακτινοβολία, το θερμικό σοκ, η αναστολή της πρωτεινόςύνθεσης, η διέγερση από κυτοκίνες (π.χ TNF- α) (Guyton et al., 1996; Jordanov and Magun, 1999; Verheij et al., 1996) και θεωρείται ότι κατέχουν αποφασιστικό ρόλο μεταξύ άλλων και στην διαδικασία της απόπτωσης (Cano and Mahadevan, 1995; Chen and Tan, 2000; Chen et al., 1996; Sluss et al., 1994).

1.8.2. JNK και απόπτωση

Οι JNKs ενεργοποιούνται μέσω διπλής φωσφορυλίωσης από τις MKK4 και MKK7 MAP2K, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να ενεργοποιηθούν από 14 διαφορετικές MAP3K, εκ των οποίων η πιο καλά χαρακτηρισμένη και αναγνωρισμένη για την συμμετοχή και τον ρόλο της στην απόπτωση είναι η ASK-1 (Apoptosis Signal Regulating Kinase 1) (Matsuzawa and Ichijo, 2001; Nagai et al., 2007).

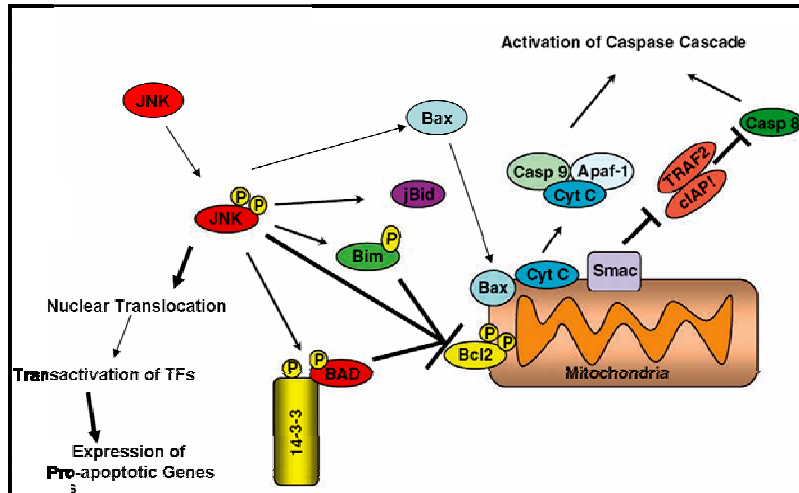
Η πρώτη παρατήρηση που τεκμηρίωνε ξεκάθαρα τον κεντρικό ρόλο που διαδραματίζουν οι JNKs στη διαδικασία της απόπτωσης έγινε το 1996 από την ερευνητική ομάδα του Chen Y.R., η οποία έδειξε ότι η έκθεση Jurkat κυττάρων σε γ -ακτινοβολία οδήγησε στην παρατεταμένη φωσφορυλίωση της JNK1 και τελικά στην απόπτωση των κυττάρων (Chen et al., 1996). Εν συνεχεία, ακολούθησαν πολλές παρόμοιες μελέτες που επιβεβαίωναν τον ρόλο των JNKs στην απόπτωση (Verheij et al., 1996; Wilson et al., 1996; Zanke et al., 1996). Χρησιμοποιώντας τεχνικές απαλειφής των JNK1 και JNK2 γονιδίων σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικών (MEFs) που εκτέθηκαν σε ιονίζουσα ακτινοβολία, διαπιστώθηκε ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα παρουσίαζαν ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στην απόπτωση (Tournier et al., 2000) Από την αντίθετη πλευρά όμως, διαπιστώθηκε ότι η έκθεση κυττάρων σε διάφορους αναπτυξιακούς παράγοντες αν και προκάλεσε την ενεργοποίηση της JNK1, το χρονικό διάστημα που διήρκεσε η φωσφορυλίωσή της ήταν πολύ συντομότερο, οδηγώντας τελικά στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Είναι επομένως σαφές ότι η παροδική ενεργοποίηση των JNKs συσχετίζεται με την επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ η παρατεταμένη φωσφορυλίωση τους οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο όπως χαρακτηριστικά απεικονίζεται στην Εικόνα 8. (Chen and Tan, 2000)



Εικόνα 8: Η παροδική ενεργοποίηση των JNK/p38 συσχετίζεται με την επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ η παρατεταμένη φωσφορυλίωση τους οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο (Matsuzawa and Ichijo, 2008)

Κατά τη διαδικασία της απόπτωσης, οι JNKs αφού ενεργοποιηθούν από τις ανοδικές κινάσες τους μπορούν να δράσουν μέσω δύο κατευθύνσεων χωρίς να αναιρεί η μια την άλλη. Μπορούν είτε να μετακινηθούν στον πυρήνα φωσφορυλιώνοντας και ενεργοποιώντας μεταγραφικούς παράγοντες που με την σειρά τους ρυθμίζουν την έκφραση προαποπτωτικών γονιδίων, είτε μπορούν να δράσουν μέσω της οδού των μιτοχονδρίων, φωσφορυλιώνοντας πρωτεΐνες της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, που επηρεάζουν την διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων όπως το κυτόχρωμα C στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 9) (Bogoyevitch and Kobe, 2006; Davis, 2000; Dhanasekaran and Reddy, 2008).



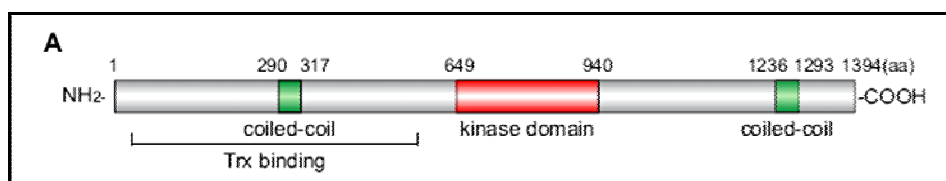
Εικόνα 9: Τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών αποτελούν υποστρώματα της JNK (Dhanasekaran and Reddy, 2008)

Πιο συγκεκριμένα, ως προς την δράση της JNK στο επίπεδο των μιτοχονδρίων, έχει αναφερθεί ότι η JNK μπορεί να έχει ως υποστρώματά της τόσο προ-αποπτωτικές όσο και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες (Aoki et al., 2002; Chauhan et al., 2003; Kharbanda et al., 2000; Schroeter et al., 2003). Για παράδειγμα έχει διαπιστωθεί ότι η φωσφορυλίωση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-XL από την JNK οδηγεί σε καταστολή της δράσης τους με αποτέλεσμα η προαποπτωτική πρωτεΐνη Bax να μπορεί να δρά χωρίς περιορισμό προκαλώντας τη δημιουργία πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Deng et al., 2001; Kharbanda et al., 2000; Yamamoto et al., 1999). Αντίστοιχα, έχει αναφερθεί ότι προαποπτωτικές πρωτεΐνες όπως το Bim, το Bad και το jBid μπορούν να ενεργοποιηθούν άμεσα από την JNK. Οι ενεργοποιημένες αυτές προαποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες μπορούν εν συνεχεία να ενισχύσουν τη δράση του Bax για την διάνοιξη πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Donovan et al., 2002; Lei and Davis, 2003; Putchu et al., 2003).

Ωστόσο, στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι υπάρχουν πολλά και μερικές φορές αντιφατικά αποτελέσματα σε σχέση με τον ακριβή μηχανισμό μέσω του οποίου η JNK ενεργοποιεί την οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών, η κυρίαρχη άποψη που επικρατεί είναι ότι η JNK έχει ως βασικό της στόχο την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax. Σε μια πρόσφατη ερευνητική μελέτη αποδείχθηκε ότι η JNK μπορεί να φωσφορυλιώσει άμεσα το Bax σε ένα κατάλοιπο θρεονίνης (Thr165), προκαλώντας την ενεργοποίησή και την άμεση μετατόπιση της στα μιτοχόνδρια, οδηγώντας τελικά στην απόπτωση (Kim et al., 2006).

1.9 ASK1

Η ASK1 (Apoptosis Signal Regulated Kinase-1) ή αλλιώς MAP3K5 ανήκει στην οικογένεια των MAP3 κινασών και αποτελεί μια από τις ανοδικές κινάσες της JNK και p38 κινάσης (Ichijo et al., 1997; Wang et al., 1996). Η ανθρώπινη ASK1 αποτελείται από 1394 αμινοξέα και περιέχει στο μέσο του μορίου της μια περιοχή κινάσης σερίνης/θρεονίνης, ενώ στο καρβοξυτελικό και αμινοτελικό άκρο της υπάρχουν αλληλουχίες «coiled-coil» μέσω των οποίων μπορεί να σχηματίζει σταθερές δομές (Εικόνα 10). Η ενεργοποίηση της ASK1, γίνεται μέσω φωσφορυλίωσης ενός καταλοίπου θρεονίνης (Thr838), καθώς διαπιστώθηκε ότι η αντικατάσταση αυτού του καταλοίπου με αλανίνη ανέστειλε ολοκληρωτικά την ενεργοποίηση της από το H₂O₂ (Tobiume et al., 2002).



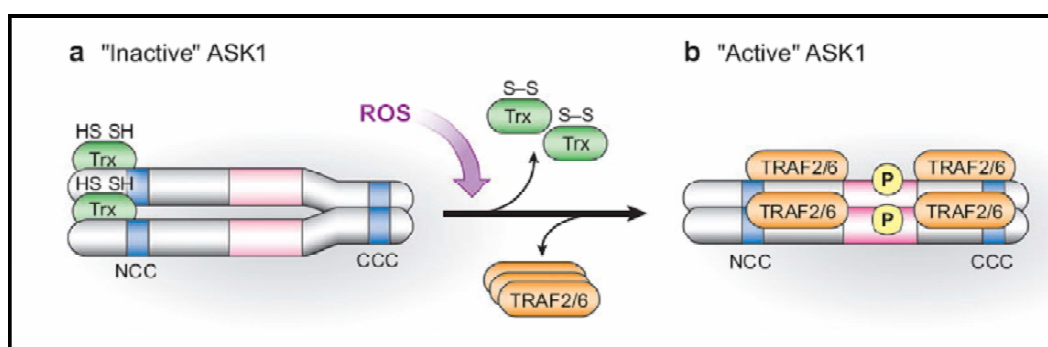
Εικόνα 10: Απεικόνιση των δομικών περιοχών της ASK-1 (Takeda et al., 2008)

Διάφορες στρεσογόνες καταστάσεις, όπως το οξειδωτικό στρες, το στρες ενδοπλασματικού δικτύου (Nishitoh et al., 2002; Urano et al., 2000), καθώς επίσης αντικαρκινικά φάρμακα (Saeki et al., 2002), ιονίζουσες ακτινοβολίες (Van Laethem et al., 2006) και φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο TNF-α (Gotoh and Cooper, 1998) μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση της. Έχει δειχθεί ότι η υπερέκφραση του αγρίου τύπου ή η συνεχής ενεργοποίησή της ASK1 μπορεί να προκαλέσει αποπτωτικό θάνατο μέσω της πορείας των μιτοχονδρίων (Hatai et al., 2000; Kanamoto et al., 2000; Tobiume et al., 2001). Αντίστοιχα κύτταρα στα οποία δεν εκφράζεται η ASK1, παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα στον κυτταρικό θάνατο (Tobiume et al., 2001) αποδεικνύοντας τον κεντρικό ρόλο της ASK1 στους μοριακούς μηχανισμούς πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου.

Με τη χρήση χρωματογραφίας μοριακής διήθησης βρέθηκε ότι η ASK1 υπό φυσιολογικές συνθήκες σχηματίζει ένα σύμπλοκο υψηλού μοριακού βάρους μέσω της αλληλουχίας που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό της άκρο. Το σύμπλοκο αυτό ονομάζεται « signalosome» (Noguchi et al., 2005) και μέχρι στιγμής, είναι πολλές οι πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με αυτό το σύμπλοκο της ASK1. Η

κυτταροπλασματική θειορεδοξίνη (Trx-1) είναι η πρώτη που ανακαλύφθηκε ότι αποτελεί μέρος αυτού του συμπλόκου υπό φυσιολογικές συνθήκες (Saitoh et al., 1998).

Πιο συγκεκριμένα, η θειορεδοξίνη στην ανηγμένη της μορφή [Trx-(SH₂)] μπορεί και συνδέεται σε μια περιοχή στο αμινοτελικό άκρο της ASK1, διατηρώντας το σύμπλοκο της ASK1 ανενεργό στο κυττόςόλιο. Η οξείδωση όμως της θειορεδοξίνης σε συνθήκες οξειδωτικού στρες προκαλεί την απομάκρυνσή της από το σύμπλοκο της ASK1 και την ταυτόχρονη στρατολόγηση μορίων της οικογένειας TRAF (TRAF2 και TRAF 6) (Fujino et al., 2007; Nishitoh et al., 1998). Οι αλλαγές που υφίσταται το σύμπλοκο της ASK1 έχουν σαν αποτέλεσμα να ερχεται σε στενή επαφή το νέο-δημιουργούμενο σύμπλοκο και η ASK1 να υφίσταται αυτοφωσφορυλίωση (Thr838) (Εικόνα 11). Επομένως, η ενεργοποίηση της ASK1 εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση της θειορεδοξίνης. Αν η θειορεδοξίνη βρίσκεται στην ανηγμένη της μορφή, τότε η ASK1 διατηρείται ανενεργή στο κυτταρόπλασμα, ενώ αντίθετα, όταν η θειορεδοξίνη οξειδώνεται, απομακρύνεται από το σύμπλοκο της ASK1 και η ASK1 αυτοενεργοποιείται.



Εικόνα 11: Μηχανισμός ενεργοποίησης της ASK-1 (Takeda et al., 2008)

Εκτός από την θειορεδοξίνη, έχει βρεθεί ότι υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την ASK1 και που μπορούν να επηρεάσουν ανασταλτικά τη δράση της. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι η γλουταρεδοξίνη (Grx) παρουσιάζει σχεδόν παρόμοια δράση με αυτή της θειορεδοξίνης (Song and Lee, 2003; Song et al., 2002). Επιπλέον έχει διαπιστωθεί ότι η ASK1 αποτελεί υπόστρωμα των φωσφατάσων PP5 και PP2C, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των φωσφατάσων σερίνης/θρεονίνης. Πιο συγκεκριμένα για την PP5 φωσφατάση έχει βρεθεί ότι προσελκύεται στην ενεργοποιημένη ASK1 και την αποφωσφορυλιώνει (Morita et al., 2001), ενώ αντίθετα για την PP2C, έχει δειχθεί ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες

διατηρεί μια σταθερή σύνδεση με την ASK1, η οποία όμως μετά από την έκθεση κυττάρων σε H₂O₂ σταδιακά χάνεται (Saito et al., 2007).

1.10 MAP φωσφατάσες

Οι MAP φωσφατάσες (MAPK phosphatases, MKPs) ανήκουν στην οικογένεια των φωσφατασών διπλής εξειδίκευσης (Dual Specificity Phosphatases, DUSPs) (Patterson et al., 2009). Οι MKPs ρυθμίζουν τη σηματοδότηση των MAP κινασών μέσω διπλής αποφωσφορυλίωσης φωσφο-τυροσινικών και φωσφο-θρεονινικών καταλοίπων στην ίδια MAP κινάση («TXY-μοτίβο») (Camps et al., 2000; Dickinson and Keyse, 2006; Farooq and Zhou, 2004). Έως τώρα έχουν χαρακτηριστεί 11 μέλη της οικογένειας των MKPs που μοιράζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά, καθώς αποτελούνται από μια καρβοξυτελική καταλυτική περιοχή και μια αμινοτελική μη καταλυτική περιοχή.

Επειδή οι DUSPs ανήκουν στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνικών τυροσινικών φωσφατασών (PTPs), η καταλυτική περιοχή τους, η οποία βρίσκεται στο καρβοξυτελικό τους άκρο, περιλαμβάνει το χαρακτηριστικό μοτίβο «CX₅R» και επομένως η ενζυμική δραστηριότητα τους σε στεσογόνες καταστάσεις εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την δράση των ΔΜΟ λόγω του ότι η κυστεΐνη του καταλυτικού τους κέντρου είναι ευάλωτη σε οξειδωτικές τροποποιήσεις. Κατά συνέπεια, η αναστολή της ενζυματικής τους δράσης από τις ΔΜΟ αποτελεί σημείο κλειδί στην τελική απόκριση των κυττάρων σε σηματοδοτικά μονοπάτια (Kamata et al., 2005).

Εκτός από την καταλυτική περιοχή που βρίσκεται το καρβοξυτελικό τους άκρο, στο αμινο-τελικό τους άκρο υπάρχει μια δέσμη (cluster) από θετικά φορτισμένα αμινοξέα ως μέρος του μοτίβου αλληλεπίδρασης με την κινάση (kinase interacting motif, KIM). Το μοτίβο αυτό, προσδίδει εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και είναι η λιγότερο ομόλογη περιοχή μεταξύ των MKPs επιδεικνύοντας επιλεκτικότητα για διαφορετικά υποστρώματα. Κατ' αυτό τον τρόπο, ανάλογα με τις ομοιότητες στην αλληλουχία τους και την ειδικότητα έναντι των υποστρωμάτων τους, οι MKPs χωρίζονται σε 3 υποκατηγορίες (Theodosiou and Ashworth, 2002). Η πρώτη υποκατηγορία περιλαμβάνει τις DUSP1, DUSP2, DUSP4 και DUSP5, οι οποίες σύμφωνα με την βιβλιογραφία επάγονται από αυξητικούς παράγοντες και στρεσογόνα σήματα ενώ υποστρώματά τους, ανάλογα με το σύστημα μελέτης, έχει βρεθεί ότι μπορούν να αποτελούν και οι τρεις MAP κινάσες (JNK, p38, ERK). Η

δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις DUSP6, DUSP7 και DUSP9 οι οποίες αναγνωρίζουν ως υποστρώματά τους κυρίως τις ERK1 και ERK2, ενώ τέλος, οι DUSP8, DUSP10 και DUSP16 αποτελούν την τρίτη υποκατηγορία φωσφατασών διπλής εξειδίκευσης και αναγνωρίζουν ως υποστρώματά τους τις JNK και p38 κινάσες (Theodosiou and Ashworth, 2002).

1.10.1 DUSP1 και απόπτωση

Ιστορικά, η ερευνητική ομάδα του Keyse, το 1992, απομόνωσε και χαρακτήρισε ένα γονίδιο που αντιστοιχούσε σε μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 39,5 kDa τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά της οποίας έμοιαζαν σε πολύ μεγάλο βαθμό με αυτά των PTPs. Απέδειξαν δε ότι η επαγωγή του γονιδίου της πρωτεΐνης αυτής πιθανά συσχετίζεται μεταξύ άλλων και με την απόκριση των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Η φωσφατάση αυτή ήταν η DUSP1 (Keyse and Emslie, 1992). Παρόλο που αρχικά είχε φανεί ότι η DUSP1 έχει ως υπόστρωμά της μόνο την ERK1/2, περαιτέρω μελέτες απέδειξαν ότι DUSP1 μπορεί να ρυθμίζει με την ίδια αποτελεσματικότητα την ενεργοποίηση και των τριών MAP κινασών.

Αν και υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που συσχετίζουν την DUSP1 με τον κυτταρικό θάνατο και γενικότερα το οξειδωτικό στρες, υπάρχουν αρκετά αναπάντητα ερωτήματα όσον αφορά τον ρόλο και τον τρόπο δράσης της. Έχει δειχθεί ότι η επαγόμενη έκφραση της DUSP-1 σε U937 κύτταρα ανέστειλε τον κυτταρικό θάνατο μέσω αναστολής της ενεργοποίησης των JNK και p38 κινασών (Franklin and Kraft, 1997; Franklin et al., 1998). Αντίθετα, η απαλοιφή του γονιδίου της σε ινοβλάστες ποντικών που εκτέθηκαν σε ανισομικίνη προκάλεσε τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων μέσω της παρατεταμένης ενεργοποίησης των JNK και p38 κινασών (Wu and Bennett, 2005). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η έκθεση κυττάρων σε TNF- α προκάλεσε την οξείδωση και απενεργοποίηση της DUSP1 καθώς και άλλων μελών αυτής της οικογένειας, οδηγώντας στην παρατεταμένη φωσφορυλίωση της JNK και τελικά στην πρόκληση αποπτωτικού θανάτου (Kamata et al., 2005). Τέλος έχει δειχθεί ότι ένα από τα γονίδια που επάγονται μετά την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα p53 είναι και το γονίδιο της DUSP1 (Liu et al., 2008).

1.11. Σίδηρος και Μεταγωγή Σημάτων

1.11.1 Οξειδοαναγωγικά Ενεργός Σίδηρος

Η ιδιότητα των ιόντων σιδήρου να αλλάζουν την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση προσλαμβάνοντας ή αποδίδοντας ηλεκτρόνια τους εξασφαλίζει μια προνομιακή θέση στη ζώσα ύλη. Η ιδιότητά τους όμως αυτή, από την άλλη πλευρά κάνει τον σίδηρο τοξικό μιας και μπορεί να διευκολύνει την οξείδωση των συστατικών του κυττάρου. Για το λόγο αυτό, η φύση έχει προβλέψει ούτως ώστε το μεγαλύτερο μέρος του ενδοκυττάρου σιδήρου να βρίσκεται στενά συνδεδεμένο είτε στην ενδοκυττάρια αποθήκη σιδήρου, την φερριτίνη, είτε σε πρωτεΐνες και ένζυμα που συμμετέχουν σε βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως τη μεταφορά οξυγόνου, την αναπνευστική αλυσίδα, τη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, την εξουδετέρωση Δραστικών Μορφών Οξυγόνου κ.ά. Ο σίδηρος είναι κατά τέτοιον τρόπο συνδεδεμένος με τις πρωτεΐνες αυτές έτσι ώστε να αποφεύγεται η αντίδρασή του με το H_2O_2 .

Εν τούτοις ένα μικρό μέρος του σιδήρου (περίπου 1%) θεωρείται ότι βρίσκεται συνδεδεμένο στα κύτταρα είτε με χαμηλού μοριακού βάρους μόρια (ATP, ADP, κιτρικό οξύ, φωσφορικά ανιόντα) είτε με κυτταρικά μακρομόρια (νουκλεοτίδια, φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες) (Kakhlon and Cabantchik, 2002; Petrat et al., 2002). Ο σίδηρος αυτός ονομάζεται «Labile Iron Pool, (LIP)» αν και του έχουν αποδοθεί και άλλες ονομασίες όπως «ελεύθερος σίδηρος», «σίδηρος μικρού μοριακού βάρους», ή «μεταβολικά και καταλυτικά ενεργός σίδηρος» (Epsztejn et al., 1997; Petrat et al., 1999). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί και ο όρος «chelatable iron», διότι οι περισσότερες μέθοδοι ανίχνευσής του βασίζονται στη δέσμευσή του από σιδηροδεσμευτικές ενώσεις. Τέλος, ο σίδηρος αυτός καλείται και «οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος», αφού λόγω της χαλαρής του σύνδεσης, είναι ικανός να αντιδρά με το H_2O_2 και άλλα οργανικά υπεροξειδία γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία των εξαιρετικά δραστικών ριζών υδροξυλίου $\cdot OH$.

Στα κύτταρα, οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος θεωρείται πρώτον, ο σίδηρος που μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα με τη δράση του μεταφορέα δισθενών μετάλλων DMT1 (Divalent –Metal- Transporter ή Nramp2) μετά από απελευθέρωσή του από την τρανσφερρίνη στο εσωτερικό των ενδοσωματίων, δεύτερον, ο σίδηρος

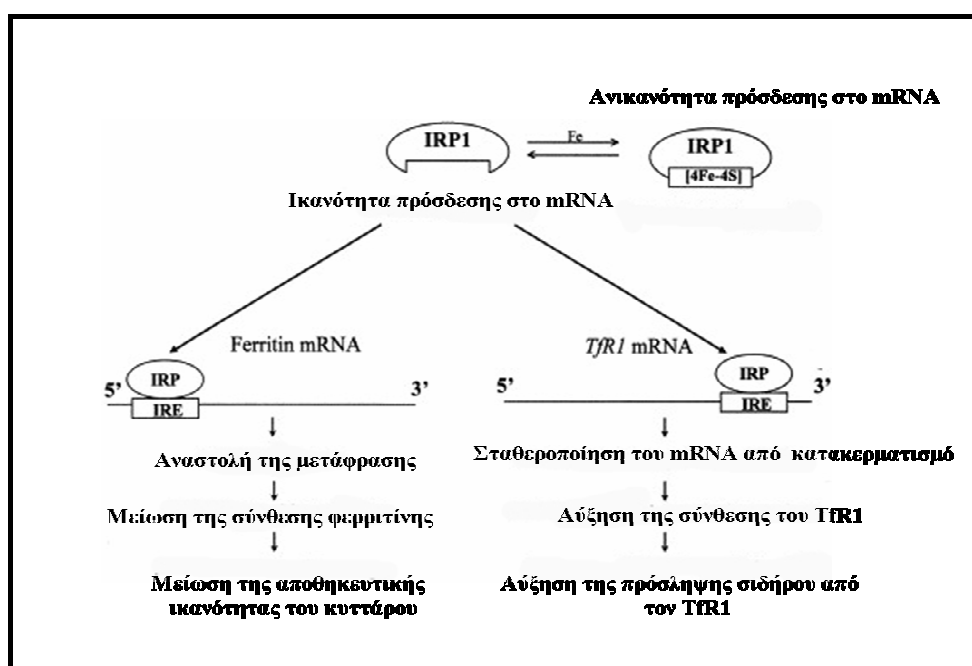
που απελευθερώνεται από την φερριτίνη (Kruszewski, 2003) και τρίτον αυτός που απελευθερώνεται στα λυσοσωμάτια μετά από αποικοδόμηση βιολογικών μορίων που περιέχουν σίδηρο.

Προκειμένου να αποφευχθεί η τοξική δράση του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει πολύπλοκους μηχανισμούς με τους οποίους ελέγχουν με ακρίβεια τα επίπεδά του έτσι ώστε να καλύπτουν τις ανάγκες τους σε σίδηρο χωρίς να κινδυνεύουν. Η ομοιοστασία του ενδοκυττάριου σιδήρου ρυθμίζεται από την πρόσληψη, τη χρησιμοποίηση και την αποθήκευση της περίσσειας του ενδοκυττάριου σιδήρου. Οι λειτουργίες αυτές επιτελούνται κυρίως από τις πρωτεΐνες υποδοχείς της τρανσφερρίνης (TFR1 και TFR2) και το μεταφορέα δισθενών μετάλλων 1 (DMT1 ή Nramp2), οι οποίες εμπλέκονται στην πρόσληψη του σιδήρου από τα κύτταρα καθώς επίσης από τη φερριτίνη (FT) η οποία αποθηκεύει την περίσσεια σιδήρου (Kruszewski, 2003). Έχει προταθεί η άποψη ότι διαταραχές στην ομοιοστασία του σιδήρου συνδέονται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως καρδιακές παθήσεις, καρκίνος, διαβήτης, νευροεκφυλιστικές ασθένειες κ.ά (Lee et al., 2004a; Richardson, 2004; Shaheen et al., 2003; Sullivan, 2003; Toyokuni, 2002).

1.11.2 Ρύθμιση των ενδοκυττάριων επιπέδων σιδήρου

Όπως προαναφέρθηκε, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει εξειδικευμένους μηχανισμούς με τους οποίους ρυθμίζουν τα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου ούτως ώστε αφενός να καλύπτονται οι ανάγκες του κυττάρου σε σίδηρο αφετέρου να αποτρέπονται οι τοξικές συνέπειες της περίσσειάς του. Κεντρικό ρόλο σε αυτούς τους μηχανισμούς ελέγχου παίζουν δύο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες ρύθμισης του σιδήρου 1 και 2 (Iron Regulatory Proteins 1 και 2, IRP1 και IRP2). Όταν τα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου είναι χαμηλά τότε οι IRPs ενεργοποιούνται και στην συνέχεια ρυθμίζουν ταυτόχρονα την μετάφραση του mRNA του υποδοχέα της τρανσφερρίνης και της κυτταροπλασματική φερριτίνης ενώ πρόσφατα αναφέρθηκε ότι ρυθμίζουν την μετάφραση του mRNA και άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του σιδήρου όπως του μεταφορέα ιόντων δισθενών μετάλλων DMT1 (ή αλλιώς Nramp2), και της φερροπορτίνης (Donovan et al., 2000; Theil and Eisenstein, 2000; Wang and Pantopoulos, 2002). Πιο συγκεκριμένα οι IRPs συνδέονται σε ειδικές περιοχές που διαθέτει το mRNA των παραπάνω πρωτεϊνών, τα οποία ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στο σίδηρο (Iron

Responsive Elements, IRE), σταθεροποιώντας ή εμποδίζοντας τη μετάφραση των αντίστοιχων mRNAs. Η σύνδεση των IRPs στα IRE του 3' άκρου σταθεροποιεί το mRNA προστατεύοντάς το από τη δράση των νουκλεασών, ενώ η σύνδεσή τους στο IRE του 5' αμετάφραστο τμήματος του mRNA αναστέλλει την μετάφρασή του. Επομένως όταν τα επίπεδα του σιδήρου είναι χαμηλά τότε οι IRPs ενεργοποιούνται οδηγώντας στην αύξηση των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα της τρανσφερίνης και παράλληλα στην αναστολή της σύνθεσης της φερριτίνης, δηλαδή αύξηση τη ικανότητας των κυττάρων να προσλαμβάνουν σίδηρο με ταυτόχρονη μείωση της ικανότητά τους να τον αποθηκεύουν. Αντίθετα, όταν τα επίπεδα του σιδήρου είναι υψηλά, τότε οι IRPs δεν είναι ενεργοποιημένες και επομένως ούτε συνδεδεμένες στα IREs με αποτέλεσμα τη σύνθεση της φερριτίνης και την αναστολή της σύνθεσης του υποδοχέα της τρανσφερίνης. Δηλαδή, στην περίπτωση αυτή ενισχύεται η αποθηκευτική ικανότητα του κυττάρου και δεσμεύεται με ασφάλεια ο πλεονάζων σίδηρος με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η τοξική του δράση.



Εικόνα 12 : Ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της IRP1 (Cairo et al., 2002)

Όταν τα επίπεδα του ενδοκυτταρίου σιδήρου είναι χαμηλά τότε το σύμπλοκο [4Fe-4S] αποικοδομείται και η IRP1 προσδένεται στο 5' ή 3' αμετάφραστο άκρο του mRNA της φερριτίνης ή του υποδοχέα της τρανσφερίνης αντίστοιχα. Αντίθετα όταν είναι υψηλά τότε σχηματίζεται το σύμπλοκο [4Fe-4S] και η IRP1 δεν έχει την ικανότητα να συνδέεται στα mRNA των παραπάνω πρωτεϊνών.

Από τις IRPs καλύτερα μελετημένη είναι IRP1, η οποία είναι ένα κυτταροπλασματικό ομόλογο της μιτοχονδριακής ακονιτάσης, ενός ενζύμου του κύκλου του κιτρικού οξέος. Σημαντικό ρόλο στην ενεργότητα της IRP1 παίζει ένα σύμπλοκο σιδήρου θείου [4Fe-4S] που βρίσκεται στο μόριό της. Όταν τα επίπεδα του σιδήρου είναι υψηλά τότε σχηματίζεται το σύμπλοκο και η IRP1 έχει ενεργότητα κυτταροπλασματικής ακονιτάσης ενώ δεν έχει την ικανότητα να συνδέεται στα IRE. Αντίθετα, σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου το σύμπλοκο αποικοδομείται και τότε η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τα IRE (Paranikolaou and Pantopoulos, 2005).

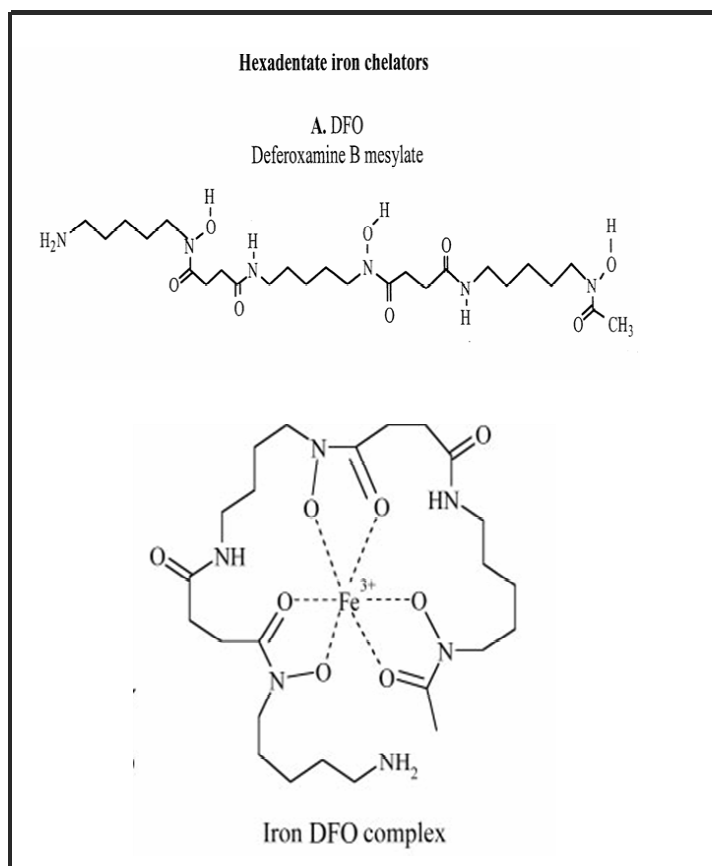
Η IRP2 είναι σε μεγάλο βαθμό ομόλογη της IRP1 παρουσιάζοντας 79% ομολογία σε επίπεδο αμινοξέων. Συνδέεται με την ίδια συγγένεια και εξειδίκευση στα IRE όπως η IRP1 αλλά διαφέρει σημαντικά με αυτή σε ότι αφορά το μηχανισμό ρύθμισης της ενεργότητά της. Η IRP2 δεν περιέχει σύμπλοκο σιδήρου θείου στο μόριό της, ούτε εμφανίζει ενεργότητα ακονιτάσης. Η πρωτεΐνη αυτή αποκρίνεται στη μείωση ή αύξηση του ενδοκυτταρίου σιδήρου με αύξηση των πρωτεϊνικών της επιπέδων ή με αύξηση της αποικοδόμησής της αντίστοιχα (Cairo and Pietrangelo, 2000; Hentze and Kuhn, 1996). Σε περίπτωση περίσσειας ενδοκυτταρίου σιδήρου, η IRP2 ουβικουϊτινιώνεται και αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα (Allerson et al., 2003; Iwai et al., 1995). Όμως ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο η IRP2 σηματοδοτείται με ουβικουϊτίνη και στην συνέχεια οδηγείται για κατακερματισμό δεν είναι ακόμα γνωστός.

1.11.3 Σιδηροδεσμευτικές ενώσεις-Δεσφεριοξαμίνη

Οι σιδηροδεσμευτικές ενώσεις αποτελούνται κυρίως από αρωματικά ετεροκυκλικά μόρια και προέρχονται είτε από πρωτογενείς σιδηροφόρες είτε από συνθετικές ενώσεις (Kalinowski and Richardson, 2005). Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι σιδηροδεσμευτικές ενώσεις περιέχουν άτομα οξυγόνου, αζώτου και θείου. Τα άτομα αυτά αποτελούν τα σημεία δέσμευσης του σιδήρου από δύο, τρεις ή έξι πλευρές, για το σχηματισμό μίας σταθερής οχταεδρικής δομής (Hider, 2002a; Hider, 2002b). Γενικότερα, οι σιδηροδεσμευτικές ενώσεις που προσδέουν το σίδηρο από έξι πλευρές, δημιουργούν πιο σταθερά σύμπλοκα.

Μία από τις πιο γνωστές και χρησιμοποιούμενες στην κλινική πράξη σιδηροδεσμευτικές ενώσεις είναι η δεσφεριοξαμίνη (DFO) (Εικόνα 13). Είναι ένας

πολύ ισχυρός σιδηροδεσμευτικός παράγοντας, που απομονώθηκε για πρώτη φορά από το βακτήριο *Streptomyces pilosus* και χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην κλινική πράξη σε παθήσεις που σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα σιδήρου (Aouad et al., 2002; Brittenham, 2003). Η DFO παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση για το σίδηρο σε σχέση με άλλα μέταλλα. Η σταθερά σύνδεσης της DFO για το σίδηρο έχει προσδιοριστεί ότι είναι 10^{31} , ενώ για το χαλκό και τον ψευδάργυρο είναι περίπου 10^{14} και 10^{11} αντίστοιχα. Η DFO συνδέεται σε στοιχειομετρία 1:1 με το σίδηρο και τον καθιστά μεταβολικά ανενεργό. Είναι ένα υδρόφιλο μόριο, το οποίο δε διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες, αλλά προσλαμβάνεται από τα κύτταρα με ενδοκυττάρωση υγρής φάσης και τελικά φθάνει στα λυσοσωμάτια μέσω των ενδοσωματίων (Doulias et al., 2003). Η δέσμευση του σιδήρου των λυσοσωματίων με τη χρήση της DFO έχει την ικανότητα να μεταβάλλει την ομοιοστασία του σιδήρου στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα και να προστατεύει τα κύτταρα από βλάβες στο πυρηνικό DNA (Tenopoulou et al., 2005; Tenopoulou et al., 2007). Αντίθετα, η ισχυρή δέσμευση για παρατεταμένο χρονικό διάστημα φαίνεται ότι προκαλεί απόπτωση (Amorgianiotis et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα).



Εικόνα 13: Η χημική δομή της δεσφεριοξαμίνης και το σύμπλοκο DFO:Fe (Kalinowski and Richardson, 2005)

1.11.4 Σίδηρος και Μεταγωγή Σημάτων- Αναπάντητα Ερωτήματα

Ο ρόλος του H_2O_2 ως δεύτερου διαμεσολαβητή στην μεταγωγή σημάτων, έχει μελετηθεί εκτενώς και είναι κοινώς αποδεκτό ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση πολλών κυτταρικών διεργασιών. Ελάχιστες είναι όμως μέχρι στιγμής οι διαθέσιμες αναφορές πάνω στο ρόλο (αν υπάρχει κάποιος), που πιθανώς να διαδραματίζουν τα οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα σιδήρου στους σηματοδοτικούς μηχανισμούς που εμπλέκεται το H_2O_2 (Galaris and Pantopoulos, 2008).

Σε πρόσφατες *in vivo* και *in vitro* πειραματικές μελέτες παρατηρήθηκε ότι η δέσμευση του ενδοκυττάριου σιδήρου προκάλεσε την αναστολή της έκφρασης μορίων προσκόλλησης σε συνθήκες φλεγμονής μέσω αναστολής της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων (Kartikasari et al., 2004; Li and Frei, 2006; Zhang and Frei, 2003). Αν και δεν είναι πλήρως κατανοητό, από τις μελέτες αυτές φάνηκε ότι η διαθεσιμότητα του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου μπορεί να επηρεάζει την ενεργοποίηση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων. Σε μια άλλη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η έκθεση ηπατικών φαγοκυττάρων σε TNF- α ή LPS προκάλεσε την απότομη αλλά παροδική αύξηση των επιπέδων του LIP, και ότι το γεγονός αυτό ήταν απαραίτητο για την μετέπειτα ενεργοποίηση του NF- κ B μέσω ενεργοποίησης της I κ B κινάσης (IKK) (Xiong et al., 2003). Ωστόσο, και σε αυτή την μελέτη ο λόγος για τον οποίο υπήρξε αυτή η παροδική διακύμανση των επιπέδων σιδήρου μέσα στο κύτταρο, επίσης δεν είναι πλήρως κατανοητός. Η ίδια ερευνητική ομάδα σε μια μεταγενέστερη μελέτη έδειξε ότι η αύξηση του ενδοκυττάριου σιδήρου επηρέασε την ενεργότητα ανοδικών κινασών του IKK συμπλόκου και όχι την ίδια την IKK κινάση (Chen et al., 2007). Σε μια άλλη εργασία, διαπιστώθηκε ότι η επαγόμενη από τον TNF- α ενεργοποίηση του NF- κ B προκάλεσε την απότομη αύξηση της έκφρασης της βαριάς αλυσίδας της φερριτίνης, (που αποτελεί την κύρια αποθήκη σιδήρου) με αποτέλεσμα την προστασία των κυττάρων από την παρατεταμένη ενεργοποίηση της JNK και την πρόκληση απόπτωσης (Papa et al., 2005; Pham et al., 2004). Αλλά και σε αυτή την περίπτωση χρήζει περαιτέρω μελέτης το πως ακριβώς ο σίδηρος εμπλέκεται στην συγκεκριμένη σηματοδοτική πορεία.

Αν η εμπλοκή του σιδήρου σε πορείες μεταγωγής σημάτων πραγματοποιείται ανεξάρτητα ή μέσω της συμμετοχής του σε αντιδράσεις μεταγωγής σημάτων από το H_2O_2 δεν είναι διευκρινισμένο. Σε μια πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου μας, διαπιστώθηκε ότι η έκθεση κυττάρων σε χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 , προκάλεσε

μεταβολές στην ομοιοστασία του σιδήρου, γεγονός που αποδείχθηκε με την αύξηση του ποσού του σιδήρου που δεσμεύθηκε από την καλσεΐνη (Tenopoulou et al., 2007). Η αύξηση αυτή είναι πιθανόν να οφείλεται στην απελευθέρωσή του από κυτταρικά διαμερίσματα που περιέχουν υψηλές ποσότητες σιδήρου.

Τέλος, παρόλο που υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία εστιασμένη στο ρόλο και στις συνέπειες που επιφέρουν οι οξειδωτικές τροποποιήσεις κυστεϊνικών καταλοίπων από την δράση του H_2O_2 στην μεταβίβαση κυτταρικών μηνυμάτων οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων πραγματοποιούνται αυτές οι οξειδώσεις παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Σε μια τουλάχιστον περίπτωση διαπιστώθηκε ότι η οξείδωση και απενεργοποίηση της προκασπάσης-9 από το H_2O_2 φαίνεται να διαμεσολαβείται από την παρουσία ιόντων σιδήρου (Barbouti et al., 2007).

Συνεπώς γίνεται απο όλα τα προαναφερθέντα κατανοητό, ότι η εμπλοκή του σιδήρου σε πορείες μεταγωγής σημάτων είναι ένα πεδίο με ιδιαίτερες προκλήσεις και προοπτικές. Μολονότι υπάρχουν διάσπαρτες ενδείξεις για το ρόλο του σιδήρου σε πορείες μεταγωγής σημάτων, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου τα ιόντα σιδήρου εμπλέκονται στη μεταγωγή σημάτων είναι ένα θέμα που χρειάζεται αναμφισβήτητα ιδιαίτερο ενδιαφέρον και προσοχή.

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία ξεκίνησε βασιζόμενη σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, που παρουσίαζαν ενδείξεις ότι τα οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα σιδήρου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου από το H_2O_2 (Barbouti et al., 2007, Tenopoulou et al., 2005). Οι παρατηρήσεις αυτές αποτέλεσαν το έναυσμα για την παρούσα εργασία, η οποία είχε ως στόχο τον ακριβή εντοπισμό των σημείων στα οποία δρουν τα ιόντα σιδήρου καθώς και τη διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού των αντιδράσεων στις οποίες εμπλέκεται ο σίδηρος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Amersham Biosciences Company, Buckinghamshire, England

Μονοκλωνικά αντίσωμα αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού και έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συνδεδεμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP), αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL reagent)

BioRad Laboratories Company, Richmond, CA, USA

Ακρυλαμίδιο, N-N' μεθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο, N,N,N',N'-τετραμέθυλο-αιθυλοδιαμίνη (TEMED), υπερθεϊκό αμμώνιο (APS), αντιδραστήριο Bio-Rad για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεΐνης (Protein Assay Dye Reagent Concentrate)

BD Biosciences Pharmigen (USA)

Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού για την κασπάση-3 συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (CPP32:HRPO), Φθορογόνο υπόστρωμα κασπάσης-3 (Ac-DEVD-AMC), Αννεξίνη-V συνδεδεμένη με φλουορεσκεΐνη

Boehringer Mannheim Company, Mannheim, Germany

RNAαση-A

Cal.Biochem. Company, Schwalbach, Germany

Φθορογόνο υπόστρωμα κασπάσης-9 (Ac-LEHD-AFC)

Cell Signaling Technology, Inc. R&D System

Μονοκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι της ASK1 και έναντι της φωσφορυλιωμένης της μορφής (p-ASK1 Thr845). Μονοκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι της κινάσης SARK/JNK και έναντι της φωσφορυλιωμένης της μορφής (p-JNK Thr183/Tyr185).

Gibco BRL Company, Grand Island, NY, USA

Ορός από έμβρυο βοός (FCS), πλαστικά για τις κυτταροκαλλιέργειες, PMSF, πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη και πρωτεΐνάση K.

Menzel-Glaset Company, Menzel, Germany

Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου

Merck Company, Darmstadt, Germany

Βρωμιούχο αιθίδιο, κυανού του τροπανίου (trypan blue), Υπεροξείδιο του Υδρογόνου (H₂O₂)

Molecular Probes, Eugene, OR, USA

Ιωδιούχο Προπίδιο(PI)

Novartis Company, Basle, Switzerland

Δεσφεριοξαμίνη (DFO)

R & D Systems

Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι του κυτοχρώματος C

Roche Diagnostics Company, Mannheim, Germany

Απροτινίνη

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι της θειορεδοξίνης (Trx) και έναντι της φωσφατάσης DUSP1

Schleicher and Schuell Company, Dassel, Germany

Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Optitran BA-S 85)

Sigma Company, St. Louis, MO, USA

Καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, δωδεκυλοθειϊκό νάτριο SDS, Triton X-100, προπανοεστέρας του σουλφονικού οξέος (CHAPS), διθειοθρεϊτόλη (DTT), πεπσατίνη A, λευπεπτίνη, χρωστική Hoechst 33342, πορτοκαλί της ακριδίνης (acridine orange, AO), N-αιθυλ-μαλεϊμίδιο (NEM) μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της πρωτεΐνης Bax, μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της β-ισομορφής της ακτίνης, αναστολείς των MAP κινασών JNK (SP600125), p38 (SB202190) και ERK (PD98059)

Για την παρασκευή διαλυμάτων, όλα τα χημικά αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας.

2.2 Καλλιέργειες κυττάρων

2.2.1 Διατήρηση κυτταρικών σειρών

Τα κύτταρα διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα κατεψυγμένα σε δοχεία που περιέχουν υγρό άζωτο (-196 °C). Η διαδικασία κατάψυξης τους είναι η ακόλουθη: Κύτταρα στην εκθετική φάση ανάπτυξης τους συλλέγονται και φυγοκεντρώνται στα 700 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau,

Germany) για 5 λεπτά. Ακολουθεί επαναιώρηση σε 5 ml PBS και φυγοκέντρηση όπως και προηγουμένως. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται στο διάλυμα κατάψυξης, το οποίο αποτελείται από 90% εμβρυϊκό ορό μόσχου (FCS) και 10% διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Ένα ml του παραπάνω μίγματος ($5-7,5 \times 10^6$ κύτταρα) μεταφέρεται σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης, τα οποία ψύχονται σταδιακά. Αρχικά τοποθετούνται στους 4°C για περίπου 10 λεπτά, στη συνέχεια σε καταψύκτη -80°C για 48 ώρες, και αργότερα τοποθετούνται στο δοχείο υγρού αζώτου, όπου και διατηρούνται μέχρι την χρήση τους. Η απόψυξή τους γίνεται γρήγορα με τη μεταφορά του σωληναρίου κατάψυξης στους 37°C . Το περιεχόμενο του μεταφέρεται σε φυγοκεντρικό σωλήνα με 9 ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και φυγοκεντρείται στα $700 \times \text{g}$ για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και καλλιεργούνται στις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας για 24 ώρες.

2.2.2 Κυτταρικές σειρές και συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας.

Η κυτταρική σειρά Jurkat προέρχεται από T-λεμφοκύτταρα ασθενούς με οξεία λευχαιμία. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σαν εναιώρημα σε RPMI-1640 το οποίο περιέχει 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (FCS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ στρεπτομυκίνη.

Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λόρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία τα οποία είχαν πριν επωαστεί με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I και πλυθεί με PBS. Το θρεπτικό υλικό στο οποίο αναπτύσσονταν ήταν M199 εμπλουτισμένο με 20% εμβρυϊκό ορό μόσχου (FCS), 0,05mg/ml ECGS, 0,051U ηπαρίνης/ml και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, γινόταν διασπορά των κυττάρων σε αραιώση 1 προς 4. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενιάς 2-6.

Ο χειρισμός των κυττάρων γινόταν σε εστία κάθετης νηματικής ροής ώστε να εξασφαλίζεται περιβάλλον απομονωμένο από την ατμόσφαιρα προς αποφυγή μολύνσεων. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο στον οποίο η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 37°C , επικρατούν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα είναι εμπλουτισμένη με 5% CO_2 ώστε να ρυθμίζεται σε σταθερή τιμή το pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.

2.2.3 Διαμόλυνση κυττάρων

Οι αδenoϊοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σημασμένοι με μια μικρή αλληλουχία αμινοξέων myc και εξέφραζαν είτε την αγρίου τύπου μορφή της DUSP1 (AdDUSP1wt) είτε την καταλυτικά ανενεργή μορφή της (AdDUSP1/CS), όπου η κυστεΐνη του ενεργού κέντρου της DUSP1(Cys258) είχε μεταλλαχθεί σε σερίνη. Τα HUVE κύτταρα, προκειμένου να μολυνθούν και να εκφράσουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες, καλλιεργήθηκαν και επώαστηκαν με τον ανασυνδιασμένο ιό σε αναλογία ικών σωματιδίων/αριθμό κυττάρων (Multiplicity of Infection, MOI) 200 για 24 ώρες. Η έκφραση των πρωτεϊνών ελεγχόταν κάθε φορά με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

2.2.4 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων

Η μέτρηση της βιωσιμότητας έγινε με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρωστικής κυανού του τροπανίου (trypan blue dye exclusion) από τα ζωντανά κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0,25% χρωστικής σε 0,15 M NaCl. Σε ένα μέρος εναιωρήματος κυττάρων προστέθηκε ένα μέρος διαλύματος της χρωστικής, το μίγμα μεταφέρθηκε σε αιμοτοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer και παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο. Τα ζωντανά κύτταρα φαίνονταν φωτεινά και διάφανα ενώ τα νεκρά εμφανίζονταν βαθύ μπλε. Η βιωσιμότητα είναι το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων στο σύνολο αυτών που μετρήθηκαν.

2.3 Μέθοδοι

2.3.1 Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση κυτταρικού DNA

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση των σχάσεων στις διπλές αλυσίδες του DNA. Μετά την εκχύλιση το DNA ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης και εμφανίζονται οι ζώνες του. Σε αντίθεση με το DNA των φυσιολογικών κυττάρων, που δεν μετακινείται κατά την ηλεκτροφόρηση λόγω του υψηλού του μοριακού βάρους, το DNA των αποπτωτικών κυττάρων το οποίο σχάζεται από ειδικές ενδονουκλεάσες (Enari et al., 1998) εμφανίζει μια χαρακτηριστική μορφή με ευδιάκριτες ζώνες (ladder pattern) και οι οποίες είναι τμήματα DNA πολλαπλάσια των 180-200 ζευγών βάσεων. Αντίθετα, στο DNA των νεκρωτικών κυττάρων

προκαλείται τυχαία θραυσματοποίηση και κατά την ηλεκτροφόρηση τα θραύσματα αυτά μετατοπίζονται στην πηκτή και εμφανίζουν μια συνεχή ζώνη (smear). Έτσι, είναι δυνατόν να διαχωριστεί η ενδονουκλεοσωμική σχάση, που είναι χαρακτηριστική του αποπτωτικού θανάτου, από την τυχαία σχάση στο DNA, που είναι αποτέλεσμα του νεκρωτικού θανάτου.

Απομόνωση του DNA

Μετά την επώαση τους 3×10^6 κύτταρα συλλέχθηκαν και ξεπλύθηκαν 2 φορές με κρύο PBS (450 x g, 4°C), επαναιωρήθηκαν σε 500 μl διαλύματος λύσης (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA, 1% SDS, 0,1% NaCl), προστέθηκε διάλυμα 0,6 mg/ml πρωτεϊνάσης K 0,6 mg/ml και ακολούθησε ολονύκτια πέψη στους 37° C υπό ανάδευση. Τα δείγματα αναμείχθηκαν με ίσο όγκο μίγματος φαινόλης / χλωροφορμίου και αναδεύτηκαν ήπια για 1 ώρα. Το γαλάκτωμα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε στα 16000 x g για 10 λεπτά με αποτέλεσμα να διαχωριστούν η υδατική φάση, που περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα από την οργανική φάση, ενώ η ενδιάμεση στοιβάδα περιέχει τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες. Η αποπρωτεϊνωμένη υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέους φυγοκεντρικούς σωλήνες και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίστηκαν με αιθανόλη. Συγκεκριμένα επώαστηκαν ολονύκτια στους -20° C με 2 όγκους ψυχρής απόλυτης αιθανόλης και 1/10 όγκου διαλύματος 3 M οξικού νατρίου pH 5,2. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g για 15 λεπτά στους 4° C και η στοιβάδα που κατακρημνίστηκε ξεπλύθηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες με 70 % ψυχρής αιθανόλης για την απομάκρυνση αλάτων και μικρών οργανικών μορίων. Στην συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και η στοιβάδα που περιείχε το DNA και το RNA, αφού ξηράθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, επαναιωρήθηκε σε διάλυμα Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Τέλος για την απομάκρυνση του RNA τα δείγματα επώαστηκαν στους 37° C για 2 ώρες με 50 μg απενεργοποιημένης RNάσης.

Ποσοτικοποίηση του DNA

Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων (φωτόμετρο MBA 2000, PERKIN ELMER) στην περιοχή του υπεριώδους. Τα νουκλεϊκά οξέα επιδεικνύουν μέγιστη απορρόφηση στα 260 nm, η οποία είναι περίπου ανάλογη με τη συγκέντρωση του

DNA. Εμπειρικά υπολογίζεται ότι συγκέντρωση DNA ίση με 50 µg/ml έχει A_{260} ίση με 1. Επιπλέον το πηλίκο A_{260}/A_{280} είναι χαρακτηριστικό για την καθαρότητα του DNA. Υψηλής καθαρότητας DNA απαλλαγμένο από προσμίξεις πρωτεϊνών ή RNA έχει $A_{260}/A_{280} \sim 1.8$. Μικρότερο πηλίκο αντιστοιχεί σε παρασκεύασμα που περιέχει ανάλογες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, ενώ, όταν το πηλίκο είναι ~ 2 , το δείγμα περιέχει RNA.

Ηλεκτροφόρηση του DNA

Για την ηλεκτροφόρηση του DNA 20 µg αναμίχθηκαν με το διάλυμα φόρτωσης σε αναλογία 5:1 (v/v). Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει 0.02 % μπλε της βρωμοφαινόλης και 40 % γλυκερόλη σε TBE (89 mM Tris, 89 mM Βορικό οξύ, 2.5 mM EDTA pH 8,0). Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων του DNA πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1,8 % σε TBE, στην οποία προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5 µg/ml. Η πηκτή αγαρόζης παρασκευάστηκε, όπως αναφέρεται αναλυτικά στο βιβλίο *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Maniatis et al., 1989). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα TBE σε συνθήκες 5 Volts/cm για περίπου 1 ώρα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εκτίθεται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (302 nm), προκειμένου να γίνουν ορατά τα σύμπλοκα του DNA με το βρωμιούχο αιθίδιο. Η αποθήκευση των αποτελεσμάτων έγινε με φωτογράφιση σε ψηφιακή κάμερα και μεταφορά σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (KODAK Digital Science 1D)

2.3.2 Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών

Για την απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος τα κύτταρα μετά την έκθεσή τους επαναιωρήθηκαν σε ψυχρό διάλυμα λύσης, που περιείχε 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 1% SDS, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5 mM DTT, 1mM PMSF, 10 µg/ml πεπσατίνης και απροτινίνης και 20 µg/ml λευπεπτίνης. Μετά από επώαση στον πάγο για 20 λεπτά, τα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά και φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g στους 4° C για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο, που αντιστοιχεί στις ολικές πρωτεΐνες του κυττάρου, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των πρωτεϊνών ASK1/ p-ASK1, JNK/ p-JNK με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Διαχωρισμός μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών

Ο διαχωρισμός των μιτοχονδρίων από το κυτταρόπλασμα έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε από τον Yang και τους συνεργάτες του (Yang et al., 1997) Τα κύτταρα (80×10^6) μετά την επώση επαναιωρήθηκαν σε πενταπλάσιο όγκο ψυχρού ισοτονικού με τα μιτοχόνδρια διαλύματος, που περιείχε 20 mM HEPES, pH 7,4, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 5 mM DTT, 250 mM σουκρόζη, 1 mM PMSF και 10 $\mu g/ml$ aprotinin, pepstatin και leupeptin. Διαβιβάστηκαν 20 φορές μέσα από θραυσματοποιητή κυττάρων (EMBL, Mechanical Workshop), μέχρι το 60% τουλάχιστον των κυττάρων να γίνουν θετικά σε Trypan blue. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στα 700 x g, για 6 λεπτά στους 4° C, ώστε να απομακρυνθούν τα ανέπαφα κύτταρα και οι πυρήνες. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε περαιτέρω στα 10000 x g για 10 λεπτά στους 4° C. Τα μιτοχόνδρια, που καταβυθίζονται κάτω από αυτές τις συνθήκες, ξεπλύθηκαν δύο φορές με το ίδιο ισοτονικό διάλυμα και χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των πρωτεϊνών των μιτοχονδρίων, όπως αναφέρεται στην συνέχεια. Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των πρωτεϊνών του υδατοδιαλυτού μέρους του κυτταροπλάσματος.

Στην συνέχεια τα μιτοχόνδρια, που απομονώθηκαν στο προηγούμενο στάδιο, λύθηκαν με επαναιώρηση για 15 λεπτά σε ψυχρό διάλυμα RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 % Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM PMSF) και τα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά και φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g για 20 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του κυτοχρώματος C και της πρωτεΐνης Bax με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών στο υδατοδιαλυτό μέρος του κυτταροπλάσματος, το υπερκείμενο των 10000 x g από την απομόνωση των μιτοχονδρίων (~0,5 ml) φυγοκεντρήθηκε περαιτέρω στα 100000 x g για 1 ώρα στους 4° C (Optima™ Ultracentrifuge, Beckman). Στις συνθήκες αυτές καθιζάνουν άλλα οργανίδια του κυττάρου (όπως τα λυσοσωμάτια τα ριβοσωμάτια τα πολυσωμάτια αλλά και οι μιτοχονδριακές μεμβράνες) και το υπερκείμενο που προέκυψε (S-100 κλάσμα) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του κυτοχρώματος C και των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και Bid.

Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα

Οι πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος απομονώθηκαν, όπως περιγράφηκε από τον Nicholson και τους συνεργάτες (Nicholson et al., 1995). Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε ψυχρό διάλυμα λύσης που περιείχε 10 mM HEPES/KOH, pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.1 % CHAPS, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml pepstatin και aprotinin και 20 µg/ml leupeptin. Μετά από επώαση στον πάγο για 20 λεπτά, τα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά και φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g στους 4° C για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο που προέκυψε αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος και χρησιμοποιήθηκε για τον φθορισμομετρικό προσδιορισμό της ενεργότητας των κασπασών -3, -9.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα παραπάνω εκχυλίσματα προσδιορίστηκε με την μέθοδο “protein microassay” της Bio-Rad, που βασίζεται στη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος στηρίζεται στη μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης από τα 465 nm στα 595 nm όταν το Coomassie Brilliant Blue G-250 δεσμευτεί σε πρωτεΐνες κάτω από όξινες συνθήκες. Αναλυτικά η μέθοδος έχει ως εξής: Σε 800 µl από τα άγνωστα δείγματα πρωτεΐνης προστέθηκαν 200 µl του αντιδραστηρίου της Bio-Rad. Μετά από έντονη ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα άγνωστα δείγματα προσδιορίστηκε με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την οποία χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης από ορό βοός (BSA).

2.3.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδου και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Scheicher & Schuell), σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που αναφέρονται στο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Maniatis et al., 1989). Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης, οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βάφτηκαν με Ponceau S (0.1 % σε οξικό οξύ) για ένα λεπτό και ακολούθησε πλύση με νερό. Η μεμβράνη επώαστηκε με το διάλυμα δέσμευσης που περιείχε 5 % άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα

φωσφορικών pH=7.4 και 0.1 % Tween 20 (PBS-T 0,1%) σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ώρες με ήπια ανακίνηση προκειμένου να δεσμευτούν οι ελεύθερες, μη ειδικές θέσεις επάνω στη νιτροκυτταρίνη. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης υπό ανατάραξη με αντισώματα έναντι της κάθε πρωτεΐνης, σε κατάλληλη αραίωση και σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα ή ολονύκτια στους 4° C. Στη συνέχεια ακολούθησαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα PBS-T 0,1%. Τέλος, η μεμβράνη επώαστηκε με αντίσωμα συζευγμένο με ραφινική υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase, HRP, Jackson Immunoresearch.) για μία ώρα σε 5 % άπαχο γάλα σε PBS-T 0,1% με ανακίνηση. Στη συνέχεια ακολούθησαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα PBS-T 0,1% και η εμφάνιση του σήματος έγινε με το εμπορικό αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL)

Ανίχνευση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας στηρίζεται στην ανίχνευση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται κατά την αποδιέγερση ενός παραγώγου της λουμινόλης. Η υπεροξειδάση παρουσία H_2O_2 σε αλκαλικό περιβάλλον οξειδώνει τη λουμινόλη σύμφωνα με την αντίδραση :



Αμέσως μετά την αντίδραση η λουμινόλη βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και επιστρέφοντας στη θεμελιώδη της κατάσταση, εκπέμπει ακτινοβολία. Η ακτινοβολία ενισχύεται σε ένταση και διάρκεια εξαιτίας της παρουσίας χημικών ενισχυτικών (όπως φαινόλες) κάνοντας δυνατή την αποτύπωση της σε φιλμ.

Για την ανίχνευση του σήματος με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, η μεμβράνη μετά την επεξεργασία με τα αντισώματα επώαστηκε με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης για 1-2 λεπτά. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε κασέτα εμφάνισης και εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ (Kodak X-OMAT/AR). Η εμφάνιση του φιλμ έγινε με τοποθέτησή του στο διάλυμα εμφάνισης (Kodak LX24, x-ray developer) ενώ το σήμα σταθεροποιήθηκε με τοποθέτηση του φιλμ στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak AL 4, X-ray fixer).

2.3.4 Ανοσοκαθίζηση πρωτεϊνών

Η τεχνική της ανοσοκαθίζησης χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση πιθανής αλληλεπίδρασης δύο πρωτεϊνών. Στο κυτταρικό εκχύλισμα αφού πρώτα έγινε ανοσοκαθίζηση της μιας πρωτεΐνης, εν συνεχεία οι πρωτεΐνες που ανοσοκατακρίθηκαν διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της άλλης πρωτεΐνης.

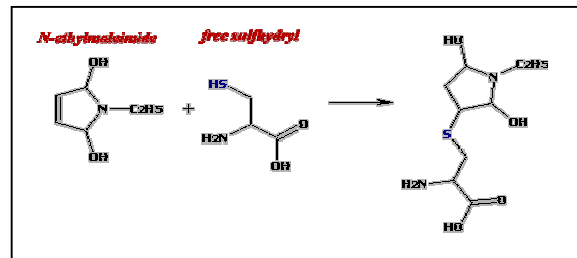
Πειραματική διαδικασία

Για την απομόνωση κυτταρικού εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε διάλυμα λύσης που περιείχε 170 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1% NP-40 και 1 mM PMSF. Μετά από επώαση στον πάγο για 20 λεπτά, τα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά και φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g στους 4° C για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε περαιτέρω στα 100000 x g για 1 ώρα στους 4° C (Optima™ Ultracentrifuge, Beckman. Σε 700 µg κυτταρικού εκχυλίσματος προστέθηκε 1µg/ml αντισώματος έναντι της υπό εξέτασης πρωτεΐνης. Το δείγμα επώαστηκε υπό ανακίνηση στους 4° C για τουλάχιστον 4 ώρες. Εν συνεχεία προστέθηκαν 20µl εναιωρήματος αποτελούμενο από σφαιρίδια σεφαρόζης και μίγμα πρωτεϊνών A/G. Η επώαση συνεχίστηκε στις ίδιες συνθήκες για επιπλέον 2 ώρες.

2.3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου απουσία αναγωγικών παραγόντων (Non Reducing SDS-RAGE)

Τα κύτταρα μετά τις εκάστοτε επώσεις ξεπλύθηκαν με διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) και επανεωρήθηκαν σε ψυχρό διάλυμα λύσης που περιείχε 20mM Tris pH= 7,3, 1% Triton-X100, 1 mM PMSF, 10 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin και 10 mM NEM (N-Ethylmaleimide). Το NEM όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 14 είναι ένα παράγωγο του μαλειμιδικού οξέος που έχει την ικανότητα να προσδένεται μόνο σε ανηγμένες κυστεΐνες, σχηματίζοντας ομοιοπολικό δεσμό. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται σε μεγάλο βαθμό η αποφυγή δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών κατά τη λύση των κυττάρων και επεξεργασία των δειγμάτων. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στα 16000 x g για 20 λεπτά στους 4° C. Από το υπερκείμενο, απομονώθηκαν 40µg/ml πρωτεΐνης μετά από ποσοτικό προσδιορισμό.

Κατά τον βρασμό των δειγμάτων, πριν την ηλεκτροφόρηση, προστέθηκε ή όχι διθειοθρεϊτόλης (DTT). Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της DUSP1.



Εικόνα 14: Αντίδραση του μαλεϊμιδικού παραγώγου NEM με σουλφιδριλικές ομάδες(-SH)

2.3.5 Φθορισμομετρικός προσδιορισμός της ενεργότητας των κασπασών-3 και -9

Η ενεργότητα των κασπασών-3 και -9 μετρήθηκε φθορισμομετρικά, όπως περιγράφηκε από τον Nicholson και τους συνεργάτες του (Nicholson et al., 1995). Χρησιμοποιήθηκε το φθορογόνο υπόστρωμα Ac-DEVD-AMC (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-Methyl-Coumarin) και Ac-LEHD-AFC (Acetyl-Leu-Glu-His-Asp-AFC). Τα τετραπεπίδια DEVD και LEHD σχάζονται από τις ενεργοποιημένες κασπάση-3 και κασπάση-9 και απελευθερώνονται οι φθορίζουσες ουσίες AMC και AFC αντίστοιχα.

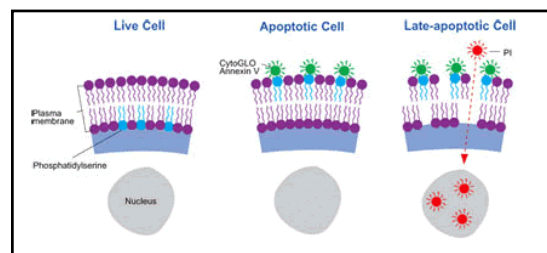
Πειραματική διαδικασία

Το πρωτεϊνικό κυτταροπλασματικό εκχύλισμα (150 μ g) επωάστηκε για 1 ώρα στους 37° C με το διάλυμα αντίδρασης (100 mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1 % CHAPS και 10 mM DTT), που περιείχε 100 μ M του φθορογόνου υποστρώματος Ac-DEVD-AMC (για την κασπάση-3) ή Ac-LEHD-AFC (για την κασπάση-9). Ο φθορισμός των AMC, που απελευθερώθηκε, μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού (F-2500 Hitachi) με διέγερση στα 380 nm και εκπομπή στα 460 nm.

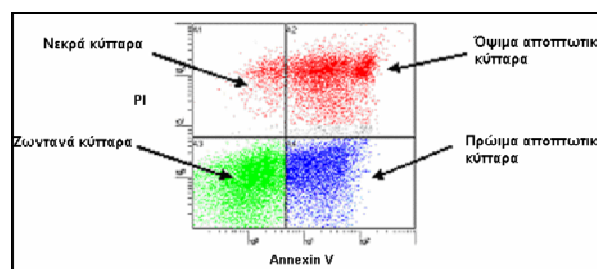
2.3.7 Κυτταρομετρία ροής

2.3.7.1 Σήμανση με Annexin/PI

Η απώλεια της ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων και η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης (phosphatidylserine, PS) στην εξωτερικό πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, αντι της εσωτερικής που βρίσκεται σε φυσιολογικές συνθήκες, αποτελεί ένα βασικό δείκτη αναγνώρισης των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων. Η αννεξίνη η οποία είναι μια εξαρτώμενη από ιόντα $-Ca^{+2}$ πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 35-36 kDa, μπορεί και συνδέεται πάνω στην φωσφατιδυλοσερίνη με ιδιαίτερα υψηλή εξειδίκευση μόνο όταν η φωσφατιδυλοσερίνη εκτίθεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Κατά συνέπεια, η σήμανση των κυττάρων με αννεξίνη συνδεδεμένη με φλουορεσκεΐνη (Annexin-FITC) αποτελεί ένα δείκτη πρώιμου αποπτωτικού θανάτου. Λόγω του ότι η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνη δεν γίνεται μονό στην περίπτωση της απόπτωσης των κυττάρων αλλά και στην περίπτωση της νέκρωσης τους όπως φαίνεται στην Εικόνα 15, χρησιμοποιήθηκε και έναν δεύτερο δείκτης, το ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI) το οποίο δένεται πάνω σε νουκλεινικά οξέα μόνο όταν η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης έχει χαθεί. Με αυτόν τον τρόπο, είναι εφικτός ο διαχωρισμός των κυττάρων σε 4 κατηγορίες ζωντανά κύτταρα, πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, όψιμα αποπτωτικά κύτταρα και νεκρά κύτταρα (Εικόνα 16).



Εικόνα 15 : Δράση της αννεξίνης και του ιωδιούχου προπιδίου



Εικόνα 16 : Διαχωρισμός κυττάρων σε 4 κατηγορίες

Πειραματική διαδικασία

Τα κύτταρα ($1,5 \times 10^6$) μετά τις αντίστοιχες επώσεις συλλέχθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ασβεστίου (0,1 M HEPES / NaOH pH=7.4, 140 mM NaCl, 25 mM CaCl₂). Στην συνέχεια επώστηκαν με Annexin-V-FITC και ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide) για 15 min στους 4°C στο σκοτάδι. Ακολούθησε προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου και ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η δέσμευση του σιδήρου αναστέλλει τη δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων στο πυρηνικό DNA

Σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας υπήρχαν σοβαρές ενδείξεις ότι τα οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα σιδήρου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό μεταγωγής του σήματος και ειδικότερα στην πρόκληση αποπτωτικού θανάτου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Barbouti et al., 2007; Tenopoulou et al., 2005). Στην παρούσα εργασία έγινε μια λεπτομερής μελέτη για τον ακριβή εντοπισμό των σημείων στα οποία δρουν τα ιόντα σιδήρου, καθώς και για τη διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού των αντιδράσεων στις οποίες εμπλέκεται ο σίδηρος.

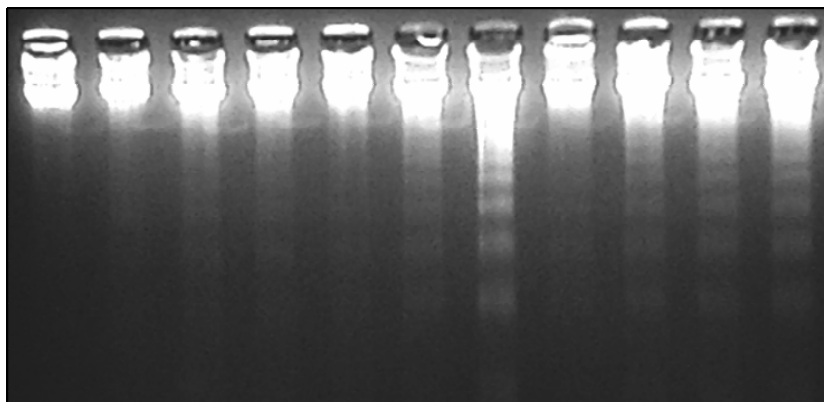
Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 17Α, σε αντίθεση με το σχηματισμό του τμηματοποιημένου DNA (DNA laddering) που προκλήθηκε από την έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 και το οποίο υποδηλώνει σχάση του DNA σε τμήματα πολλαπλάσια των 180-200 ζευγών βάσεων (χαρακτηριστικό του αποπτωτικού θανάτου), προ-επώαση των κυττάρων με το σιδηροδεσμευτικό παράγοντα δεσφεριοξαμίνη (DFO), ανέστειλε σε σημαντικό βαθμό τη δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων σε όλες τις χρονικές στιγμές (-120, -60, -20, -10 λεπτά). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση που η DFO και το H_2O_2 προστέθηκαν ταυτόχρονα ή ακόμα και μετά την προσθήκη του H_2O_2 . Ωστόσο, η αναστολή της απόπτωσης μειωνόταν σταδιακά όσο το διάστημα μεταξύ της έκθεσης των κυττάρων σε H_2O_2 και της προσθήκης DFO μειωνόταν (Εικόνα 17Β).

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την εμπλοκή των ιόντων σιδήρου στους μοριακούς μηχανισμούς πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και δείχνουν ότι τα ιόντα σιδήρου λαμβάνουν μέρος σε αντιδράσεις που έπονται της έκθεσης των κυττάρων στο H_2O_2 .

A

H₂O₂ (0,25 mM)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DFO (0,5 mM)	-	+	-120	-60	-20	-10	-	0	+10	+20	+60

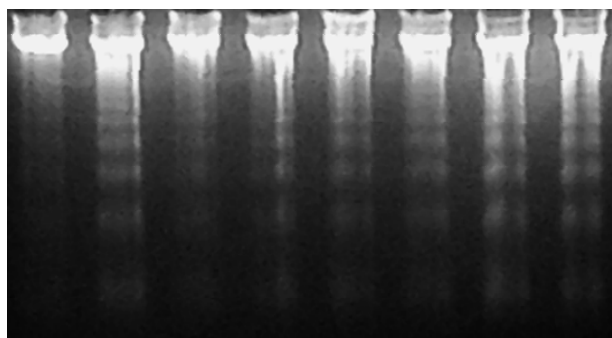
(λεπτά)



B

H₂O₂ (0,25 mM)	-	+	+	+	+	+	+	+
DFO (0,5 mM)	-	-	0	+1	+2	+3	+4	+5

(ώρες)



Εικόνα 17: Μείωση του ενδοκυττάριου σιδήρου αναστέλλει την πρόκληση ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων στο DNA

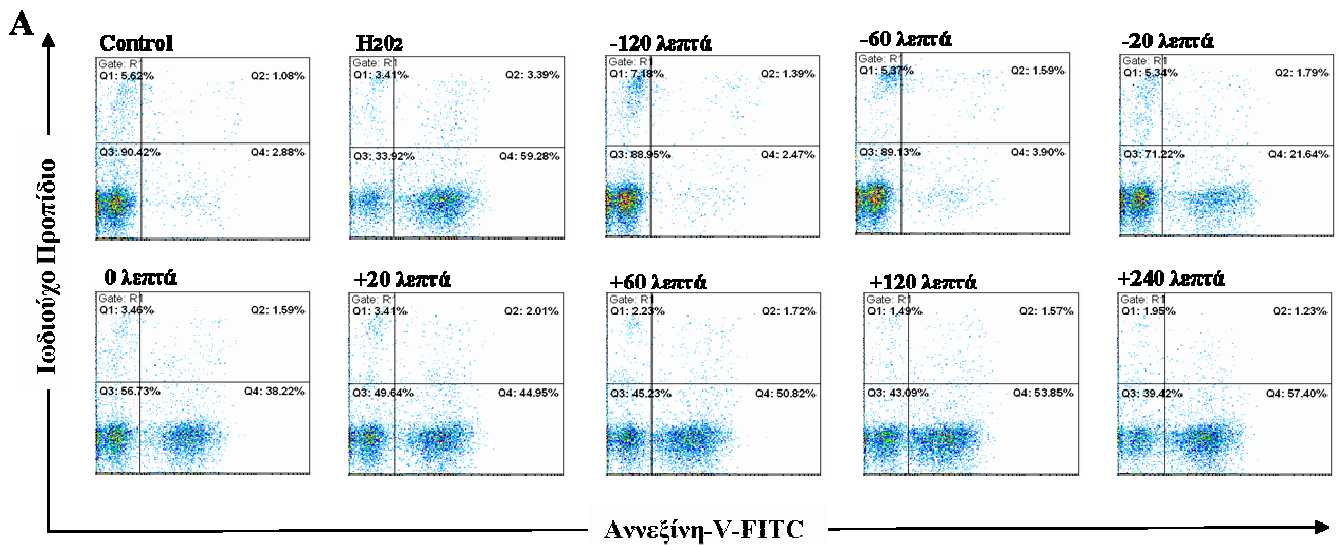
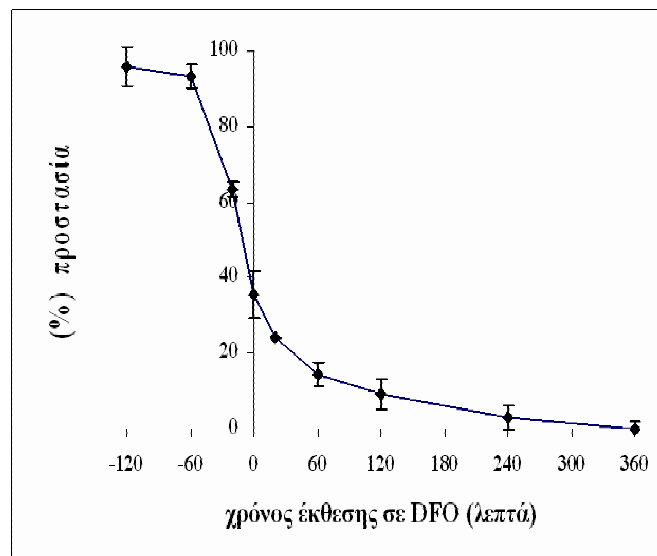
Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) επωάστηκαν με 0,5 mM DFO για διάφορα χρονικά διαστήματα πριν ή μετά την έκθεση σε συνθήκες οξειδωτικού στρες υπό την μορφή H₂O₂ (0,25 mM) (A,B). Έξι ώρες μετά την έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂ απομονώθηκε το DNA από κάθε δείγμα και η δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αгарόζης. Τα πειράματα αυτά επαναλήφθηκαν τρεις ακόμη φορές με τα ίδια αποτελέσματα.

3.2 Η δέσμευση του σιδήρου αναστέλλει την εξωτερική της φωσφατιδυλοσερίνης

Ένα άλλο χαρακτηριστικό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είναι οι μεταβολές που υφίσταται η κυτταρική μεμβράνη κατά τη διάρκεια της διεργασίας αυτής. Η απώλεια της ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων και η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης αποτελούν ένα βασικό δείκτη αναγνώρισης των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων. Η αννεξίνη συνδέεται με τη φωσφατιδυλοσερίνη όταν αυτή βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης (απόπτωση), ενώ το ιωδιούχο προπίδιο συνδέεται με το DNA των κυττάρων όταν η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης έχει χαθεί.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 18Α, τα κύτταρα μάρτυρες βρίσκονται στο πρώτο τεταρτημόριο, το οποίο σημαίνει ότι είναι αρνητικά σε αννεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο. Αντίθετα η έκθεση των κυττάρων σε 0,25 mM H₂O₂ για 6 ώρες είχε ως αποτέλεσμα ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού των κυττάρων (59,28%) να οδηγηθεί στη φάση της πρώιμης απόπτωσης όπως υποδηλώνεται με τη μετατόπισή τους στο δεύτερο τεταρτημόριο σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Η προ-επώαση των κυττάρων με 0,5 mM DFO για 120 ή 60 λεπτά πριν από την έκθεσή τους σε H₂O₂ προστάτησε ολοκληρωτικά τα κύτταρα από την πρόκληση απόπτωσης και τα έφερε στο ίδιο επίπεδο με αυτό των ανέπαφων κυττάρων. Στην περίπτωση που η DFO προστέθηκε 20 λεπτά πριν την έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂ ή ταυτόχρονα με το H₂O₂, παρατηρήθηκε επίσης προστασία αλλά σε μικρότερο βαθμό. Τέλος, η προσθήκη DFO μετά την έκθεση σε H₂O₂ οδήγησε σε σταδιακή απώλεια της προστασίας των κυττάρων.

Τα πειράματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα προηγούμενα (DNA laddering) και ενισχύουν την άποψη ότι τα οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα σιδήρου κατέχουν κεντρικό ρόλο στο μοριακό μηχανισμό πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

**B**

Εικόνα 18: Μείωση του ενδοκυττάριου σιδήρου αναστέλλει την εξωτερίκευση της φωσφατιδιλοσερίνης

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) επώαστηκαν με 0,5 mM DFO για διάφορα χρονικά διαστήματα πριν ή μετά την έκθεσή τους σε συνθήκες οξειδωτικού στρες υπό την μορφή H₂O₂ (0,25 mM H₂O₂). Σε όλες τις περιπτώσεις, ο χρόνος έκθεσης των κυττάρων σε H₂O₂ ήταν 6 ώρες. Μετά τις αντίστοιχες επώσεις, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και σημάνθηκαν με αννεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με κυτταρομετρία ροής (A). Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται υπό τη μορφή γραφικής παράστασης στην οποία απεικονίζεται το % ποσοστό προστασίας των κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο έκθεσης σε DFO (B). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές με τα ίδια αποτελέσματα.

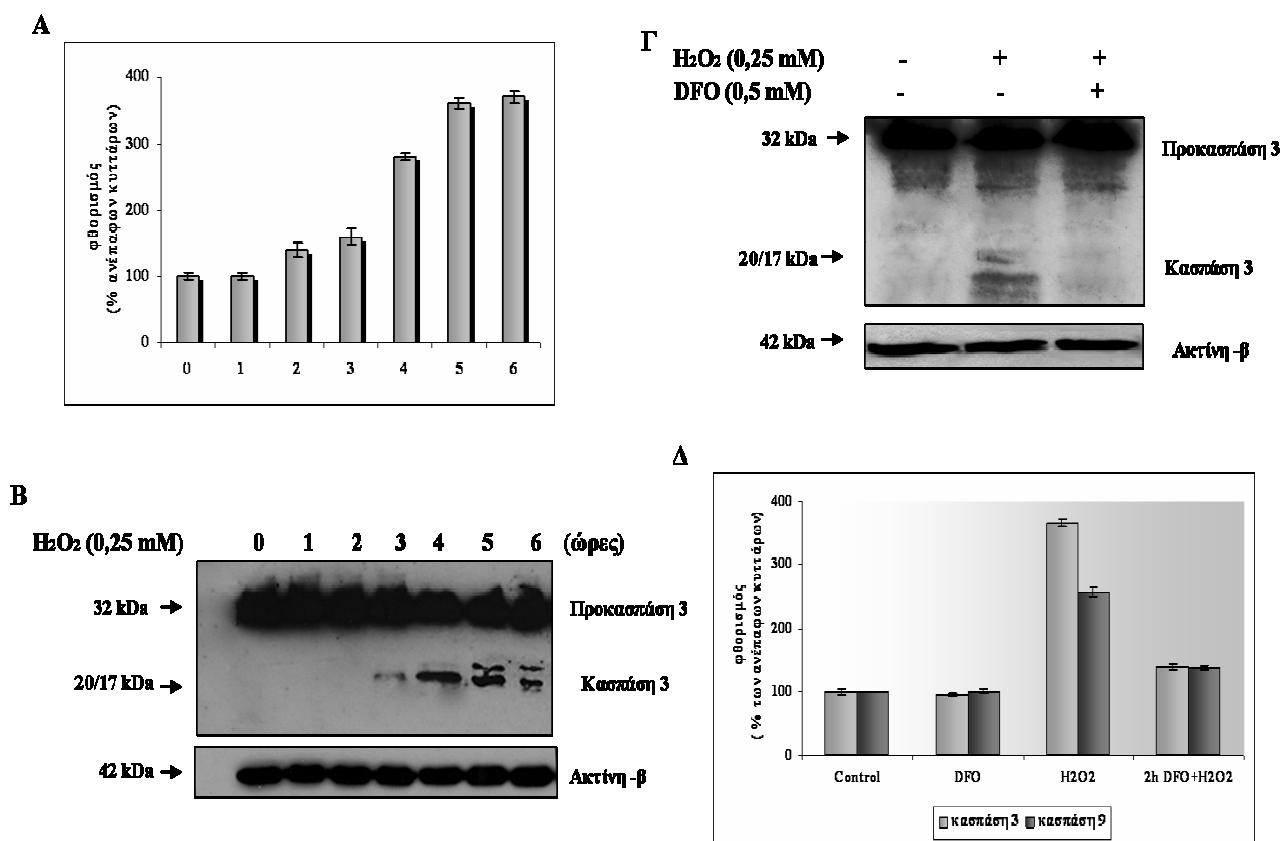
3.3 Η δέσμευση του σιδήρου αναστέλλει την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών

Για τη δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων στο DNA των κυττάρων, όπως παρατηρήθηκε προηγουμένως, είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Δυο από τα πιο σημαντικά μέλη της οικογένειας των κασπασών είναι η εναρκτήρια κασπάση-9 και η εκτελεστική κασπάση -3.

Αρχικά εξετάστηκαν η ενεργοποίηση και η σχάση της προκασπάσης-3 σε συνάρτηση με το χρόνο έκθεσης των κυττάρων σε H_2O_2 . Όπως φαίνεται στην Εικόνα 19Α, η ενεργότητα της κασπάσης-3 αυξάνει μετά τις 2 πρώτες ώρες έκθεσης σε H_2O_2 και φτάνει σε ποσοστό περίπου 270%, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, στις 5 και 6 ώρες. Αντίστοιχα, η σχάση της κασπάσης-3 παρατηρήθηκε στις 3 ώρες έκθεσης σε H_2O_2 . Η έντονη εμφάνιση των σχασμένων κομματιών της κασπάσης-3, με μοριακά βάρη 20 και 17 kDa, παρατηρήθηκε στις 5 και 6 ώρες έκθεσης σε H_2O_2 (Εικόνα 19 Β).

Προ-επώαση των κυττάρων με το σιδηροδεσμευτικό παράγοντα DFO 2 ώρες πριν από την έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 ανέστειλε χαρακτηριστικά τη σχάση της κασπάσης-3 υποδηλώνοντας ότι τα ιόντα σιδήρου είναι απαραίτητα (Εικόνα 19Γ). Επιπροσθέτως, εξετάζοντας φθορισμομετρικά την ενεργότητα των κασπασών -3 και -9 παρατηρήθηκε ότι η έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 προκάλεσε αύξηση της ενεργότητάς τους κατά 266 % και 157% αντίστοιχα σε σχέση με την ενεργότητα των ανέπαφων κυττάρων. Η δέσμευση όμως του σιδήρου ανέστειλε την ενεργοποίηση τόσο της κασπάσης-3 όσο και της κασπάσης-9, που είχε προκληθεί από το H_2O_2 , επαναφέροντας τα επίπεδα της ενεργότητάς τους περίπου στα ίδια επίπεδα με αυτά των ανέπαφων κυττάρων (Εικόνα 19Δ).

Αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα ιόντα σιδήρου είναι απαραίτητα σε κάποιο βήμα της αποπτωτικής διαδικασίας το οποίο προηγείται της ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών.



Εικόνα 19: Η δέσμευση του σιδήρου αναστέλλει την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) εκτέθηκαν σε 0,25 mM H_2O_2 για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές. Στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν αξιολογήθηκε η ενεργότητα της κασπάσης-3 από την ικανότητα της να διασπά το φθορογόνο υπόστρωμα Ac-DEVD-AMC (A) και εξετάστηκε η σχάση της προ-κασπάσης-3 με ανοσοαποτύπωση κατά Western (B).

Τα ίδια κύτταρα προ-επωάστηκαν ή όχι με 0,5 mM DFO για 2 ώρες και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 0,25 mM H_2O_2 για 6 ώρες. Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα που απομονώθηκαν ανιχνεύθηκε η σχάση της κασπάσης-3 με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Γ) και αξιολογήθηκε η ενεργότητα των κασπασών-3 και -9 από την ικανότητά τους να διασπούν τα φθορογόνα υποστρώματα Ac-DEVD-AMC και Ac-LEHD-AFC αντίστοιχα (Δ).

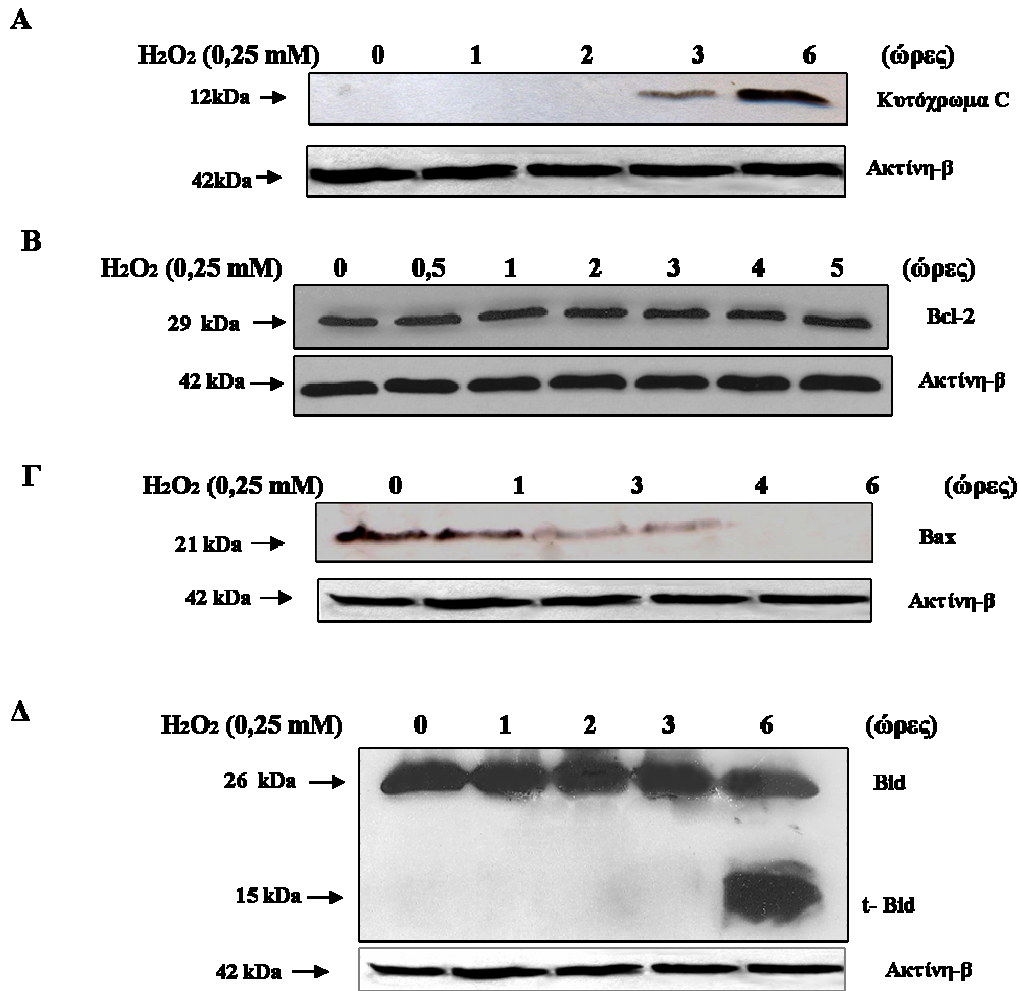
3.4 Ο ρόλος των ιόντων σιδήρου στην αποσταθεροποίηση των μιτοχονδρίων

Η ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών είναι αποτέλεσμα της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C (cyt-C) από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, όπου μαζί με τον παράγοντα Araf-1 και την προκασπάση-9, σχηματίζει το λεγόμενο αποπτώσωμα (Adrain and Martin, 2001). Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε, σε συνάρτηση με το χρόνο έκθεσης σε H₂O₂, η απελευθέρωση του cyt-C στο κυτταρόπλασμα. Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 20Α το cyt-C εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα μετά από 3 ώρες έκθεσης σε H₂O₂.

Κεντρικό ρόλο στη δημιουργία πόρων στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και στη μετέπειτα απελευθέρωση του cyt-C στο κυτταρόπλασμα διαδραματίζουν τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από αντι-αποπτωτικά μέλη που εμποδίζουν την αύξηση της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών μεμβρανών καθώς και από προ-αποπτωτικά μέλη, που ενισχύουν τη διάνοιξη πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Cory and Adams, 2002). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 20B, η έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 δε μεταβλήθηκε κατά τη διάρκεια έκθεσης των κυττάρων σε H₂O₂. Αντίθετα, παρατηρήθηκε ότι η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax απομακρύνεται από το κυτταρόπλασμα ήδη από την πρώτη ώρα έκθεσης σε H₂O₂ (Εικόνα 20Γ). Τέλος, η σχάση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bid παρατηρήθηκε 6 ώρες μετά την έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂ όπως φαίνεται από την εμφάνιση μιας μπάντας στα 15 kDa (truncated Bid, t-Bid) (Εικόνα 20Δ).

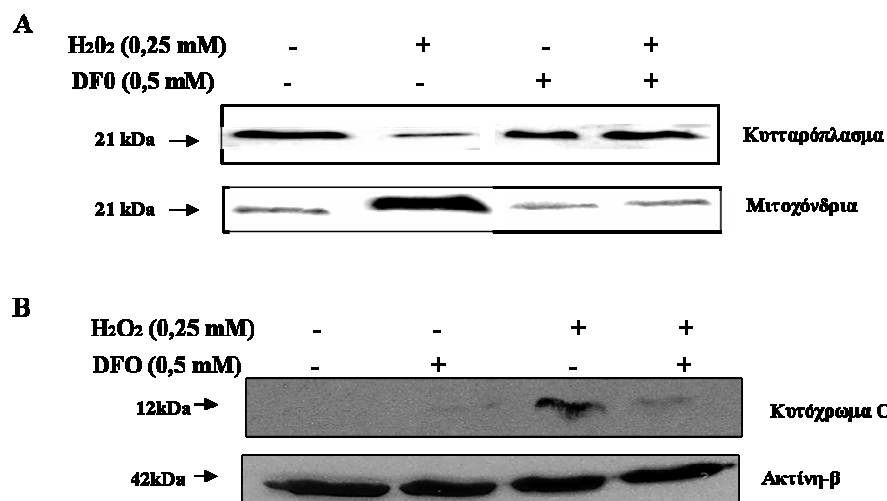
Προ-επώαση των κυττάρων με DFO 2 ώρες πριν από την έκθεσή τους σε H₂O₂, ανέστειλε τόσο τη μετατόπιση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια (Εικόνα 21Α) όσο και την απελευθέρωση του cyt-C στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 21B), υποδηλώνοντας ότι τα ιόντα σιδήρου είναι απαραίτητα για την διεκπεραίωση αυτών των διαδικασιών.

Συγκεντρωτικά, τα παραπάνω πειράματα δείχνουν ότι η μετατόπιση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια είναι ένα φαινόμενο που προηγείται της απελευθέρωσης του cyt-C στο κυτταρόπλασμα, ενώ η σχάση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bid, φαίνεται να αποτελεί ένα μεταγενέστερο φαινόμενο. Τέλος, τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν ότι τα ιόντα σιδήρου δρουν σε ένα στάδιο στον καταρράκτη της αποπτωτικής διαδικασίας που βρίσκεται πριν από το επίπεδο των μιτοχονδρίων.



Εικόνα 20: Επιπτώσεις του H₂O₂ στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα και στην ενεργοποίηση μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) εκτέθηκαν σε 0,25 mM H₂O₂ για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές και αφού απομονώθηκαν τα εκάστοτε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο *Υλικά και Μέθοδοι*, το κυτόχρωμα C (A) και οι πρωτεΐνες Bcl-2 (B), Bax (Γ) και Bid (Δ) ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα πείραματα επαναλήφθηκαν δύο φορές με τα ίδια αποτελέσματα.



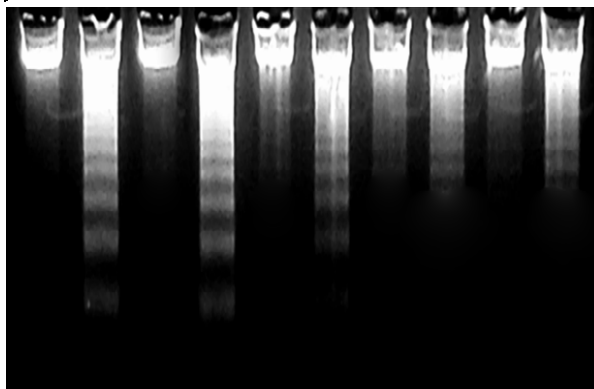
Εικόνα 21: Η δέσμευση του σιδήρου αναστέλλει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα και την μετατόπιση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) προ-επώαστηκαν ή όχι με 0,5 mM DFO για 2 ώρες και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 0,25 mM H_2O_2 για 6 ώρες. Αφού απομονώθηκαν κυτταροπλασματικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα ανιχνεύθηκαν το cyt-C (A) και η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax (B) με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα πειράματα είναι αντιπροσωπευτικά από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

3.5 Συμμετοχή των MAP κινασών στην απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 και ο ρόλος των ιόντων σιδήρου

Τα τελευταία χρόνια πληθώρα επιστημονικών μελετών έχουν δείξει ότι η ρύθμιση της δράσης των μελών της οικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών πραγματοποιείται μέσω των MAP κινασών (Bogoyevitch and Kobe, 2006; Dhanasekaran and Reddy, 2008; Kim et al., 2006; Tsuruta et al., 2004). Η πιθανή συμμετοχή των MAP κινασών στο μηχανισμό πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου στο υπό εξέταση πειραματικό μοντέλο, ελέγχθηκε κατ' αρχήν με τη χρήση εξειδικευμένων αναστολέων των κινασών JNK (SP600125), p38 (SB202190) και ERK1/2 (PB98059).

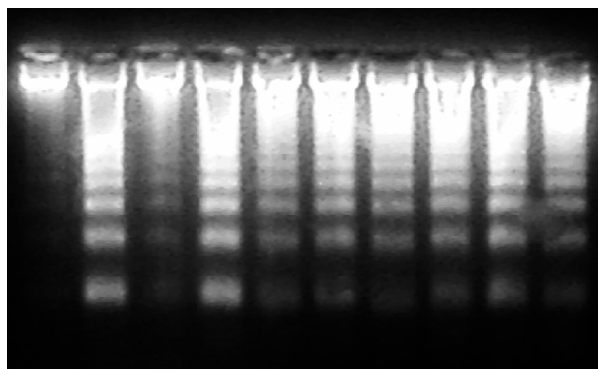
A

H₂O₂ (0,25 mM)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
SP600125 (μM)	-	-	10	10	20	20	30	30	60	60



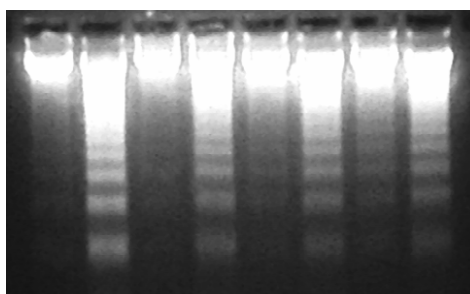
B

H₂O₂ (0,25 mM)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
SB202190 (μM)	-	-	10	10	50	50	100	100	150	150



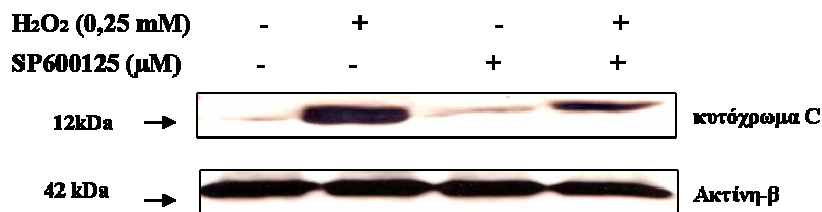
Γ

H₂O₂ (0,25 mM)	-	+	-	+	-	+	-	+
PB98059 (μM)	-	-	30	30	60	60	90	90



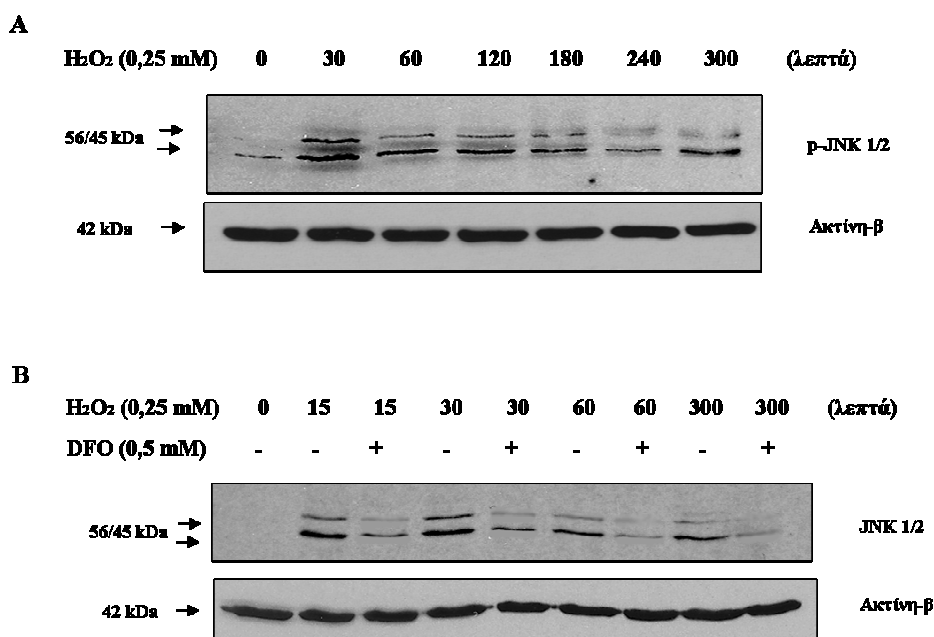
Εικόνα 22: Έλεγχος της πιθανής συμμετοχής των MAP κινασών στην απόπτωση που προκαλείται από το H₂O₂

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) προ-επωάστηκαν ή όχι για 30 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις των αναστολέων των JNK (SP600125) (A), p38 (SB202190) (B) και ERK1/2 (PB98059) (Γ) πριν εκτεθούν σε 0,25 mM H₂O₂ για 6 ώρες. Οι ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις στο DNA παρατηρήθηκαν μετά την απομόνωση και ηλεκτροφόρησή του σε πηκτή αγαρόζης. Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε δύο ακόμη φορές με τα ίδια αποτελέσματα.



Εικόνα 23. Συνέπειες του αναστολέα της JNK (SP600125) στην απελευθέρωση του κυτόχρωματος C στο κυτταρόπλασμα από το H₂O₂

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) προ-επωάστηκαν ή όχι με 30μM του αναστολέα της JNK κινάσης (SP600125) για 30 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 0,25 mM H₂O₂ για 6 ώρες. Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών απομονώθηκαν και το κυτόχρωμα C ανιχνεύτηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό από δύο ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 24 : Η δέσμευση του σιδήρου αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της JNK

A. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) εκτέθηκαν σε 0,25 mM H₂O₂ για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές. Απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και η φωσφορυλιωμένη μορφή της JNK ανιχνεύτηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

B. Τα ίδια κύτταρα προ-επωάστηκαν ή όχι με 0,5 mM DFO για 2 ώρες και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 0,25 mM H₂O₂ για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές. Απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και η φωσφορυλιωμένη μορφή της JNK ανιχνεύτηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα πειράματα επαληθεύθηκαν δύο ακόμη φορές με τα ίδια αποτελέσματα.

Η προ-επώαση των κυττάρων με τον αναστολέα της JNK κινάσης (SP600125) σε συγκεντρώσεις από 10 έως 60 μM , είχε ως συνέπεια τη μείωση των ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων που προκάλεσε η έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 (Εικόνα 22Α). Αντίθετα, ο αναστολέας της κινάσης p38 (SB202190) ήταν από μόνος του τοξικός ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (Εικόνα 22Β), ενώ με τη χρήση του αναστολέα της ERK1/2 κινάσης, δεν παρατηρήθηκε αξιόλογη προστασία στο DNA των κυττάρων (Εικόνα 22Γ). Με σκοπό να επιβεβαιωθεί περαιτέρω η πιθανή εμπλοκή της JNK κινάσης στο μηχανισμό της απόπτωσης, ελέγχθηκε αν η προ-επώαση των κυττάρων με τον αναστολέα της JNK επηρεάζει ή όχι την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 23, ενώ η έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 για 6 ώρες προκάλεσε την απελευθέρωση του cyt-C στο κυτταρόπλασμα όπως ήταν αναμενόμενο, η προ-επώαση τους με τον αναστολέα της JNK, ανέστειλε σε μεγάλο βαθμό την απελευθέρωση του.

Ακολούθως, εξετάστηκε η φωσφορυλίωση της JNK κινάσης σε συνάρτηση με το χρόνο έκθεσης των κυττάρων σε H_2O_2 . Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24Α, στα 30 λεπτά έκθεσης σε H_2O_2 παρατηρήθηκε χαρακτηριστική αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της JNK, τα οποία στη συνέχεια μειώθηκαν, με την JNK όμως να παρέμεινε φωσφορυλιωμένη καθ' όλη τη διάρκεια της αποπτωτικής διαδικασίας. Η δέσμευση του σιδήρου πριν την έκθεση σε H_2O_2 , ανέστειλε σημαντικά τη φωσφορυλίωση της JNK σε όλα τα χρονικά διαστήματα που ελέγχθηκαν, υποδηλώνοντας ότι τα ιόντα σιδήρου εμπλέκονται στο μηχανισμό ενεργοποίησής της (Εικόνα 24Β).

3.6 Τα ιόντα σιδήρου εμπλέκονται στο μηχανισμό ενεργοποίησης της ASK1

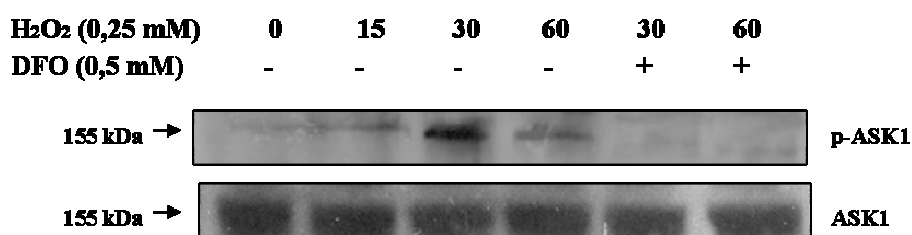
Η ASK1 είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης της οικογένειας των MAP3 κινασών, η οποία θεωρείται υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των JNK και p38 κινασών (Ichijo et al., 1997). Υπό φυσιολογικές συνθήκες η ASK1 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα υπό τη μορφή συμπλόκου με μόρια θειορεδοξίνης (Trx-1) αλλά και άλλους παράγοντες (Fujino et al., 2007; Saitoh et al., 1998). Λόγω της σύνδεσής της με την Trx-1, το σύμπλοκο της ASK1 διατηρείται στο κυτοσόλιο ανενεργό. Η απομάκρυνση της Trx-1 από το σύμπλοκο της ASK1, λόγω οξειδωσής της από τις ΔΜΟ, οδηγεί στην αλλαγή της διαμόρφωσης του συμπλόκου και στην ταυτόχρονη

στρατολόγηση μορίων της οικογένειας TRAF (TRAF2 και TRAF 6). Οι αλλαγές που υφίσταται η ASK1 έχουν σαν αποτέλεσμα να έρχεται σε στενή επαφή το νέο-δημιουργούμενο σύμπλοκο και η ASK1 να υφίσταται αυτοφωσφορλίωση.

Στην Εικόνα 25 φαίνεται ότι η έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 προκάλεσε την φωσφορλίωση της ASK1 από τα πρώτα 15 λεπτά, παρουσιάζοντας ένα μέγιστο στα επίπεδα φωσφορλίωσής της στα 30 λεπτά, το οποίο μειώθηκε σημαντικά στα 60 λεπτά. Δέσμευση του ενδοκυττάρου σιδήρου, με την προσθήκη δεσφεριοξαμίνης στο καλλιεργητικό υλικό 2 ώρες πριν από την έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 ανέστειλε πλήρως τη φωσφορλίωση της ASK1, υποδηλώνοντας ότι τα ιόντα σιδήρου είναι απαραίτητα για την ενεργοποίησή της.

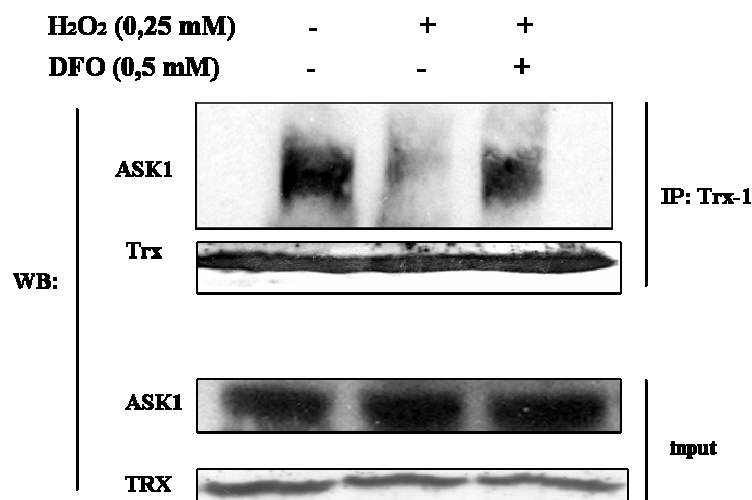
Με σκοπό να διερευνηθεί με ποιόν ακριβώς τρόπο τα ιόντα σιδήρου εμπλέκονται στο μηχανισμό ενεργοποίησης της ASK1, εξετάστηκε η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών ASK1 και Trx-1 με την τεχνική της συν-κατακρίμνησης. Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 26, στα κύτταρα μάρτυρες η ASK1 συν-καταβυθίστηκε με την Trx-1, όπως ήταν αναμενόμενο, αφού υπό φυσιολογικές συνθήκες η Trx-1 βρίσκεται συνδεδεμένη με την ASK1 σε μορφή συμπλόκου. Στην περίπτωση που τα κύτταρα εκτέθηκαν σε H_2O_2 για 30 λεπτά, η ASK1 δεν κατακρημνίστηκε μαζί με την Trx-1, αφού το H_2O_2 είχε προκαλέσει την οξειδωση της Trx-1 και κατ' επέκταση την απομάκρυνσή της από το σύμπλοκο της ASK1. Όταν όμως απομακρύνθηκε ο σίδηρος μέσω προ-επάσης των κυττάρων με DFO πριν την έκθεση τους σε H_2O_2 , παρατηρήθηκε ότι ένα σημαντικό μέρος της ASK1 καταβυθίστηκε μαζί με την Trx-1.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι ο σίδηρος είναι απαραίτητος για την οξειδωση της θειορεδοξίνης από το H_2O_2 . Φαίνεται ότι τα ιόντα σιδήρου μπορούν και επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση της θειορεδοξίνης και με τον τρόπο αυτό να εμπλέκονται στο μηχανισμό ενεργοποίησης της ASK1.



Εικόνα 25: Η δέσμευση του σιδήρου αναστέλλει την φωσφορυλίωση της ASK1

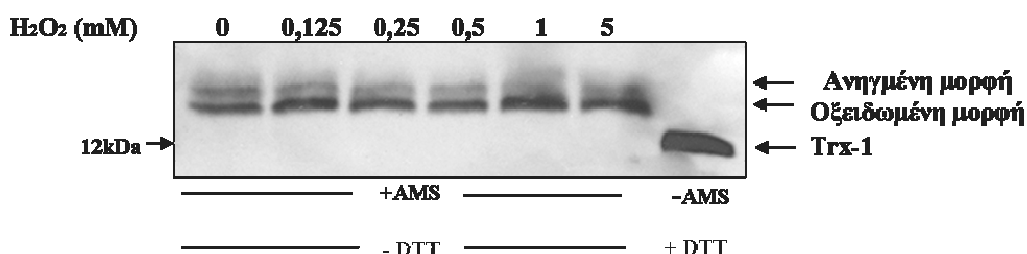
Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) προ-επωάστηκαν ή όχι με 0,5 mM DFO για 2 ώρες και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 0,25 mM H₂O₂ για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές. Αφού απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western, χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης και της συνολικής μορφής της ASK1. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό από δύο ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 26: Η δέσμευση του σιδήρου αναστέλλει την απομάκρυνση της θειορεδοξίνης από την ASK1

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) προ-επωάστηκαν με 0,5 mM DFO για 2 ώρες και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 0,25 mM H₂O₂ για 30 λεπτά. Το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα απομονώθηκε και πραγματοποιήθηκε ανοσοκαταβύθιση με αντίσωμα έναντι της Trx-1 και ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της ASK1. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Θέλοντας να ελεγχθεί περαιτέρω ο ρόλος του σιδήρου στο μηχανισμό οξειδωσης της ολικής θειορεδοξίνης των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, έγιναν προσπάθειες να αναπτυχθεί μια τεχνική μέσω της οποίας είναι εφικτός ο διαχωρισμός της οξειδωμένης από την ανηγμένη της μορφή (Ritz and Beckwith, 2002). Ένα ενδεικτικό παράδειγμα από τις προσπάθειες που έγιναν, απεικονίζεται στην Εικόνα 27. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2 για 10 λεπτά και στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα προστέθηκε το μαλειμιδικό παράγωγο AMS. Το AMS αντιδρά μόνο με τις ανηγμένες (SH) σουλφιδριλικές ομάδες πρωτεϊνών, γεγονός που αυξάνει το μοριακό τους βάρος. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 27, στα δείγματα που είχαν τροποποιηθεί με AMS, εμφανίστηκαν δυο μπάντες, εκ των οποίων η υψηλότερου μοριακού βάρους αντιστοιχεί στην ανηγμένη μορφή της Trx-1, ενώ η χαμηλότερου μοριακού βάρους αντιστοιχεί στην οξειδωμένη της μορφή. Το τελευταίο δείγμα, αντιπροσωπεύει τον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή το δείγμα που δεν τροποποιήθηκε με AMS. Παρά τις προσπάθειες δεν κατέστη εφικτό να εξαχθούν συγκεκριμένα συμπεράσματα λόγω της ύπαρξης σημαντικού ποσού οξειδωμένης Trx-1 στα κύτταρα μάρτυρες. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται σε οξειδωτικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της λύσης των κυττάρων και της επεξεργασίας των δειγμάτων.



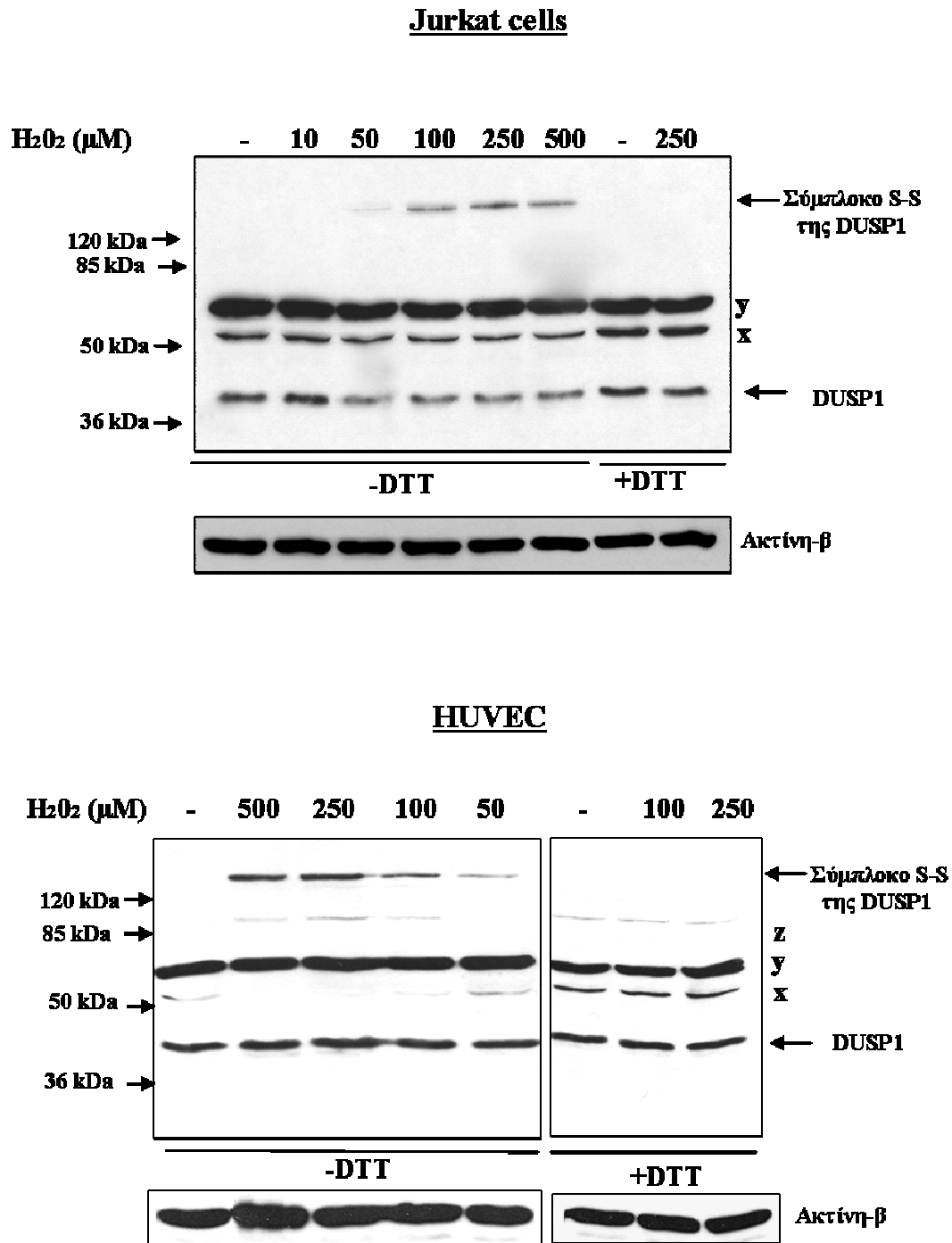
Εικόνα 27: Ενδεικτικό αποτέλεσμα για τον έλεγχο της οξειδοαναγωγικής κατάστασης της Trx-1

3.7 Το H₂O₂ προκαλεί την οξείδωση της DUSP1

Εκτός από την ASK1 η ενεργοποίηση της οποίας, όπως προαναφέρθηκε, προκαλεί την φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της JNK, κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργότητας της JNK κατέχουν και οι αντίστοιχες φωσφατάσες, οι οποίες ελέγχουν την ταχύτητα αποφωσφορυλίωσής της. Μια από τις φωσφατάσες που θεωρείται σημαντική για την αποφωσφορυλίωση της JNK, είναι η φωσφατάση διπλής εξειδίκευσης DUSP1 (Dual Specificity Phosphatase 1). Καθώς η DUSP1 ανήκει στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνικών τυροσινικών φωσφατασών (PTPs), η καταλυτική της περιοχή χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μιας ιδιαίτερα ευαίσθητης σε οξειδωτικές τροποποιήσεις κυστεΐνη.

Στα παρακάτω πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικά είδη κυττάρων, κύτταρα Jurkat (T-λεμφοκύτταρα) και ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE. Τα κύτταρα αρχικά επώαστηκαν για διάφορες χρονικές στιγμές από 10 λεπτά έως 5 ώρες με 0,25 mM H₂O₂. Αφού απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι), κατά το βρασμό των δειγμάτων και πριν την ηλεκτροφόρηση τους προστέθηκε ή όχι διθειοθρεϊτόλη (DTT) και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της DUSP1. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 28, η επώαση και των δύο τύπων κυττάρων με H₂O₂ προκάλεσε την εμφάνιση μιας νέας μπάντας σε μοριακό βάρος περίπου 180 kDa. Στα κύτταρα Jurkat η ένταση της μπάντας εμφανίζει μέγιστο στα 30 λεπτά, το οποίο χάνεται σταδιακά μετά την 1^η ώρα. Αντίθετα, στην κυτταρική σειρά HUVE παρατηρήθηκε ένα μέγιστο στην 1^η ώρα, το οποίο εν συνεχεία μειώθηκε μεν, αλλά διατηρήθηκε μέχρι και τις 3 ώρες. Επώαση των εκχυλισμάτων παρουσία DTT πριν από την ηλεκτροφόρησή τους, οδήγησε στην εξαφάνιση αυτής τη μπάντας και στις δύο είδη κυττάρων, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός ή περισσότερων δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ της DUSP1 και μιας ή περισσότερων άγνωστων πρωτεϊνών.

Στην συνέχεια, οι δύο τύποι κυττάρων εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂, από 10 έως 500μM, για 10 λεπτά. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29, η επώαση και των δύο τύπων κυττάρων με H₂O₂ προκάλεσε μια δόσο-εξαρτώμενη αύξηση στην ένταση της μπάντας, η οποία παρουσία DTT, όπως και προηγουμένως εξαφανίστηκε, υποδηλώνοντας την ύπαρξη δισουλφιδικών δεσμών.



Εικόνα 29: Συνέπειες της αύξησης της συγκέντρωσης του H₂O₂ στην οξείδωση της DUSP1

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) και κύτταρα HUVE (3×10^5) εκτέθηκαν για 10 λεπτά σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂. Αφού απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, στα δείγματα πριν από την ηλεκτροφόρηση προστέθηκε ή όχι διθειοθρεϊτόλη (DTT) και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της DUSP1. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Ωστόσο, εκτός από το υψηλού μοριακού βάρους σύμπλοκο της DUSP1 που ανιχνεύθηκε, θα πρέπει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκαν και κάποιες άλλες αξιοσημείωτες αλλαγές. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 28, σε μοριακό βάρος λίγο μεγαλύτερο των 50 kDa παρατηρήθηκαν δυο επιπλέον μπάντες (x και y), οι οποίες φαίνεται ότι επηρεάζονται από την έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂. Στα κύτταρα HUVE που οι αλλαγές φαίνονται πολύ πιο χαρακτηριστικά, παρατηρήθηκε ότι η μπάντα x εξαφανίστηκε όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε H₂O₂ για 10, 30 και 60 λεπτά ενώ επανεμφανίστηκε στις 3 και 5 ώρες (Εικόνα 28). Παρουσία DTT, η ένταση της μπάντας x γίνεται αρκετά πιο έντονη, ενώ το επάνω μέρος της μπάντας y φαίνεται να εξαφανίζεται. Αντίστοιχα στην περίπτωση των Jurkat κυττάρων, αν και η μείωση της έντασης της μπάντας x δε φαίνεται καθαρά, και σε αυτή την περίπτωση είναι εμφανές ότι παρουσία DTT ένα μέρος της μπάντας y εξαφανίζεται (Εικόνα 28). Είναι πιθανό η έντονη μπάντα y να αντιστοιχεί σε πολλές πρωτεΐνες που επικαλύπτονται μεταξύ τους και οι οποίες συνδέονται ειδικά ή μη με το αντίσωμα της DUSP1. Μια εξ'αυτών πιθανά να αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη x η οποία συνδέεται μέσω δισουλφιδικού δεσμού με κάποια άλλη πρωτεΐνη με αποτέλεσμα να εμφανίζεται σε υψηλότερο μοριακό βάρος. Αντίστοιχα η μπάντα x αντιπροσωπεύει την ίδια πρωτεΐνη πριν την σύνδεσή της με δισουλφιδικό δεσμό. Τέλος, μόνο στα HUVE κύτταρα παρατηρήθηκε ότι με την προσθήκη H₂O₂ εμφανίστηκε μια μπάντα z, σε μοριακό βάρος πάνω από τα 85kDa, η οποία όμως δεν χάνεται παρουσία DTT, γεγονός που σημαίνει ότι το σύμπλοκο πρωτεϊνών που αντιπροσωπεύει η μπάντα z, έχει δημιουργήσει ένα άλλο είδος ομοιοπολικού δεσμού ο οποίος όμως δεν είναι δισουλφιδικός.

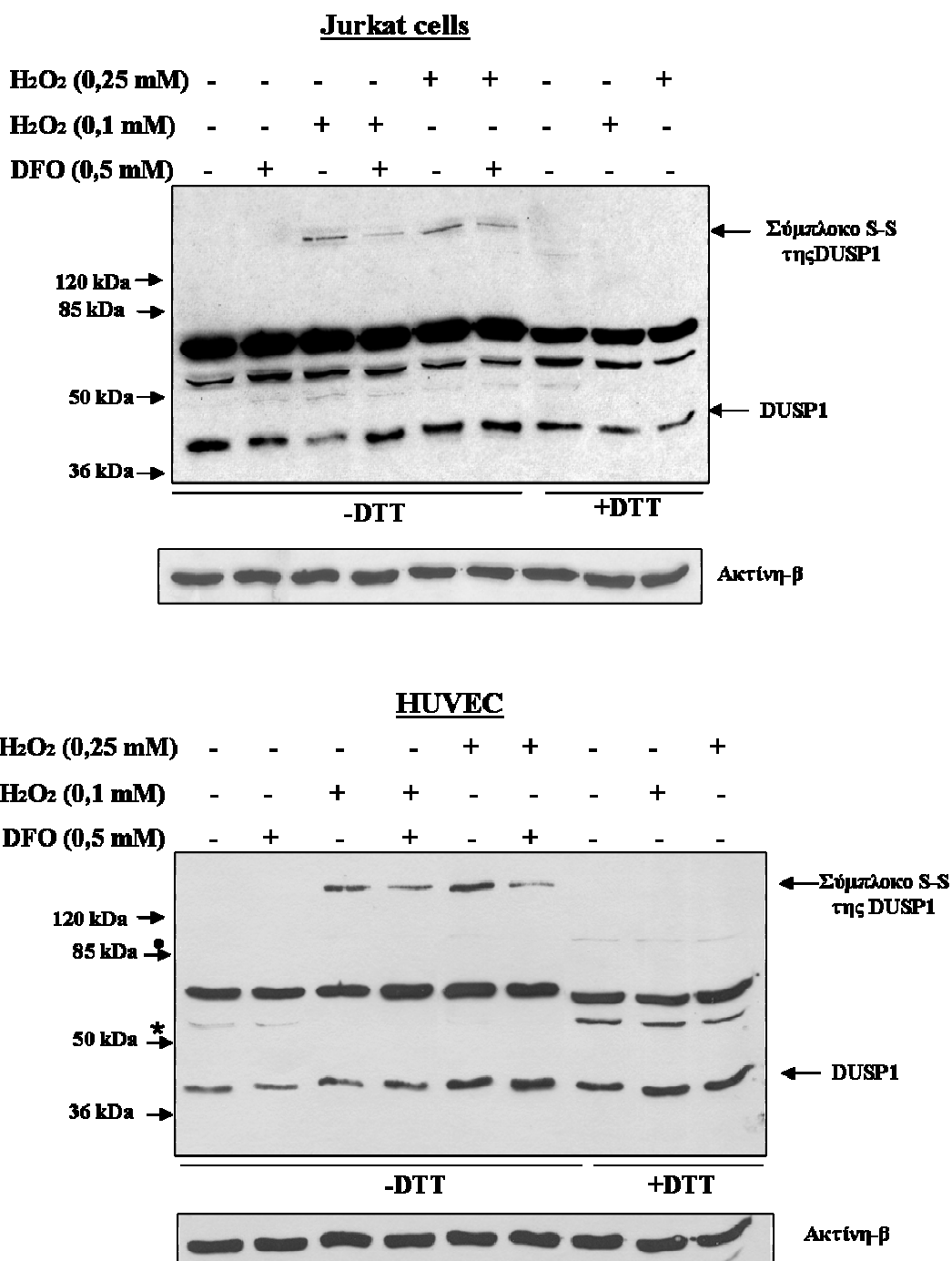
Συμπερασματικά, από τα παραπάνω πειράματα φαίνεται ότι η DUSP1 είναι επιρρεπής σε οξειδωτικές τροποποιήσεις, καθώς παρουσία H₂O₂, ένα μέρος της οξειδώνεται δημιουργώντας δισουλφιδικό(ούς) δεσμό(ούς) με μια ή περισσότερες άγνωστες πρωτεΐνες. Η οξείδωση αυτή είναι μία αντιστρεπτή τροποποίηση, κάτι που πιθανώς εξηγείται είτε από το γεγονός ότι ενδοκυττάρια αναγωγικά ένζυμα ανάγουν το οξειδωμένο σύμπλοκο της DUSP1 είτε από το γεγονός ότι όταν η DUSP1 οξειδώνεται, οδηγείται προς αποικοδόμηση. Όσον αφορά την πρώτη εκδοχή θα μπορούσαμε να πούμε ότι παρουσία H₂O₂ ένα μέρος της DUSP1 οξειδώνεται, όταν όμως το H₂O₂ έχει απομακρυνθεί, τότε η πρωτεΐνη ανάγεται ξανά.

3.8 Η δέσμευση του σιδήρου αναστέλλει την οξείδωση της DUSP1

Τα προηγούμενα αποτελέσματα έστειψαν το ενδιαφέρον στην εξέταση της πιθανής συμμετοχής των ιόντων σιδήρου στο μηχανισμό με τον οποίο προκαλείται η δημιουργία δισουλφιδικού(ών) δεσμού(ών) στην DUSP1 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Για το λόγο αυτό κύτταρα Jurkat και κύτταρα HUVE προ-επώαστηκαν ή όχι με 0,5 mM DFO για 2 ώρες και στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη H₂O₂ στο καλλιεργητικό υλικό, σε συγκεντρώσεις 0,1 ή 0,25 mM για 10 λεπτά. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 30, η έκθεση των κυττάρων και στις δύο συγκεντρώσεις H₂O₂ οδήγησε στην οξείδωση της DUSP1 (δημιουργία δισουλφιδικού(ών) δεσμού(ών)). Απομάκρυνση όμως του ενδοκυττάρου σιδήρου, μέσω προ-επώασης των κυττάρων με DFO πριν από την έκθεσή τους σε H₂O₂ ανέστειλε σε σημαντικό βαθμό την οξειδωτική τροποποίηση της DUSP1 και στις δύο κυτταρικές σειρές.

Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι τα ιόντα σιδήρου παίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό οξείδωσης της DUSP1 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Επομένως, η ενδοκυττάρια διαθεσιμότητα των ιόντων σιδήρου φαίνεται να αποτελεί αποφασιστικό παράγοντα στην ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης της DUSP1.



Εικόνα 30: Η δέσμευση του σιδήρου αναστέλλει την οξείδωση της DUSP1

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml)(A) και κύτταρα HUVE (3×10^5) προ-επωάστηκαν ή όχι με 0,5 mM DFO για 2 ώρες και κατόπιν εκτέθηκαν είτε σε 0,1 mM H₂O₂ είτε σε 0,25 mM H₂O₂ για 10 λεπτά. Αφού απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, στα δείγματα πριν από την ηλεκτροφόρηση προστέθηκε ή όχι διθειοθρεϊτόλη (DTT) και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της DUSP1. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

3.9 Η κυστεΐνη του ενεργού κέντρου της DUSP1 (Cys258) δεν είναι η μοναδική κυστεΐνη που μπορεί να οξειδώνεται

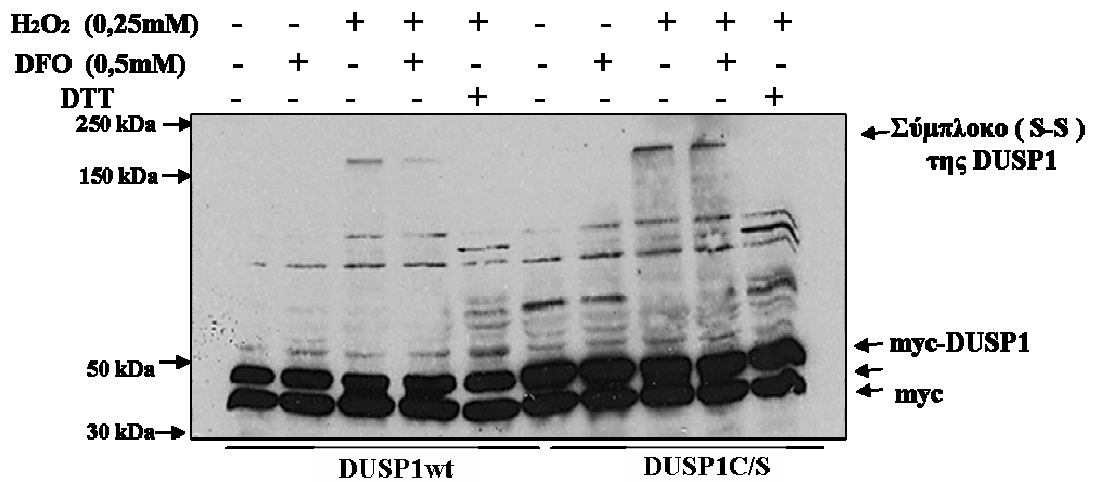
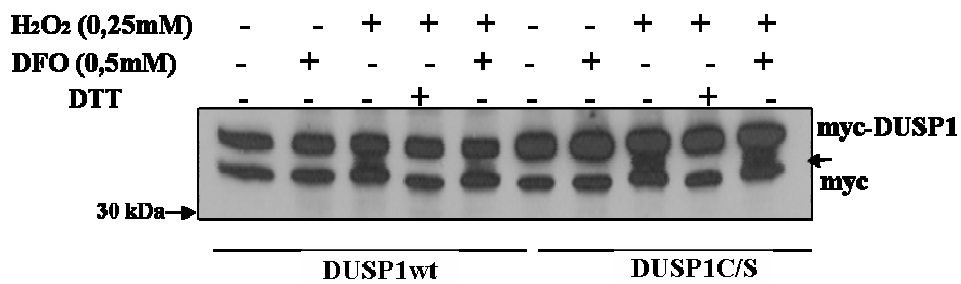
Η DUSP1 περιέχει στο μόριο της συνολικά 12 κυστεΐνες, εκ των οποίων μόνο μια βρίσκεται στο ενεργό της κέντρο και είναι υπεύθυνη για την καταλυτική της δράση. Με σκοπό να ελεγχθεί αν η συγκεκριμένη κυστεΐνη είναι αυτή που οξειδώνεται παρουσία H_2O_2 , χρησιμοποιήθηκαν αδενοϊοί που εξέφραζαν, είτε την αγρίου τύπου DUSP1(AdDUSP1wt), είτε την καταλυτικά ανενεργή μορφή της (AdDUSP1/CS), στην οποία η επιρρεπής σε οξειδωτικές τροποποιήσεις κυστεΐνη του καταλυτικού της κέντρου είχε αντικατασταθεί από ένα κατάλοιπο σερίνης.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 31A, στην περίπτωση που στα κύτταρα υπερεκφράστηκε η αγρίου τύπου DUSP1 παρατηρήθηκε, όπως ήταν αναμενόμενο, ότι η έκθεση των κυττάρων σε 0,25mM H_2O_2 για 10 λεπτά προκάλεσε τη δημιουργία του οξειδωμένου συμπλόκου της DUSP1. Ωστόσο, και στην περίπτωση που υπερεκφράστηκε η καταλυτικά ανενεργή μορφή της φωσφατάσης (DUSP1/CS) παρατηρήθηκε η εμφάνιση μιας μπάντας με παρόμοιο μοριακό βάρος. Επώαση αυτών των εκχυλισμάτων παρουσία DTT πριν την ηλεκτροφόρησή τους, και στις δύο περιπτώσεις, οδήγησε στην εξαφάνιση της μπάντας. Προ-επώαση των κυττάρων με DFO πριν την έκθεση σε H_2O_2 ανέστειλε σημαντικά την ένταση αυτής της μπάντας στα κύτταρα που είχε υπερεκφραστεί η αγρίου τύπου DUSP1. Αντίθετα, στα κύτταρα που υπερεκφράστηκε η καταλυτικά ανενεργή μορφή της φωσφατάσης (DUSP1/CS) δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη αναστολή.

Το παραπάνω αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι η κυστεΐνη του ενεργού κέντρου της DUSP1, δεν είναι η μοναδική κυστεΐνη που μπορεί να υπόκειται σε οξειδωτική τροποποίηση. Φαίνεται ότι μια άλλη ή περισσότερες κυστεΐνες στο μόριο της DUSP1, εκτός από αυτή του ενεργού της κέντρου (Cys258), μπορούν να συνδέονται με δισουλφιδικό(ούς) δεσμό(ούς) με μία ή περισσότερες πρωτεΐνες σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, ενώ τα ιόντα σιδήρου εμπλέκονται στο μηχανισμό μέσω του οποίου το H_2O_2 προκαλεί τον σχηματισμό του οξειδωμένου συμπλόκου της DUSP1, όταν αντικαθίσταται η κυστεΐνη του ενεργού της κέντρου η δέσμευση του σιδήρου δεν μπορεί να αναστείλει το σχηματισμό του νέου οξειδωμένου συμπλόκου που δημιουργείται.

Μια δεύτερη αλλά εξίσου ενδιαφέρουσα παρατήρηση σε αυτό το πείραμα ήταν η εμφάνιση μιας νέας μπάντας μεταξύ της DUSP1 και της ενδογενούς πρωτεΐνης myc, η οποία δεν είχε εμφανιστεί στα προηγούμενα πειράματα ελέγχοντας τα ενδογενή επίπεδα της DUSP1. Στην εικόνα 31B, η έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂ προκάλεσε την εμφάνιση αυτής της μπάντας τόσο στα κύτταρα που είχε υπερεκφραστεί η αγρίου τύπου DUSP1 (AdDUSP1wt), όσο και στα κύτταρα που είχε υπερεκφραστεί η καταλυτικά ανενεργή DUSP1(AdDUSP1/CS). Επώαση αυτών των εκχυλισμάτων με DTT προκάλεσε την εξαφάνιση της μπάντας, υποδηλώνοντας ότι η μπάντα αυτή αντιπροσώπευε ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών συνδεδεμένο μέσω δισουλφιδικού δεσμού. Προ-επώαση των κυττάρων με DFO πριν την έκθεσή τους σε H₂O₂ φαίνεται ότι μείωσε την ένταση αυτής της μπάντας στα κύτταρα που είχε υπερεκφραστεί η αγρίου τύπου DUSP1 ενώ αντίθετα, στα κύτταρα που είχε υπερεκφραστεί η καταλυτικά ανενεργή μορφή της φωσφατάσης (DUSP1/CS) δεν παρατηρήθηκε παρόμοια μείωση.

Μια πιθανή εξήγηση αυτής της παρατήρησης είναι ότι η μπάντα αυτή αντιπροσωπεύει έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό που σχηματίζει η DUSP1 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, ο οποίος δημιουργείται μόνο όταν υπερεκφράζεται η DUSP1, με αποτέλεσμα να μετακινείται πιο γρήγορα καθώς έχει σχηματίσει μια πιο συμπαγή δομή. Φαίνεται επίσης ότι η κυστεΐνη του ενεργού κέντρου της DUSP1 δεν είναι απαραίτητη για τη δημιουργία αυτού του δισουλφιδικού δεσμού. Επιπλέον τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ενώ τα ιόντα σιδήρου εμπλέκονται στον μηχανισμό μέσω του οποίου το H₂O₂ προκαλεί το σχηματισμό αυτού του δεσμού, στην περίπτωση που αντικαθίσταται η κυστεΐνη του ενεργού κέντρου της DUSP1 με σερίνη, η δέσμευση του σιδήρου δεν μπορεί να αναστείλει το σχηματισμό του.

A**B**

Εικόνα 31: Η αντικατάσταση της κυστεΐνης του ενεργού κέντρου της DUSP1 δεν αναστέλλει την επαγόμενη από το H₂O₂ οξείδωση της

Κύτταρα HUVE μολύνθηκαν με τον αδενοϊό AdDUSP1wt και AdDUSP1/CS σε MOI 200 για 24 ώρες. Τα κύτταρα προ-επωάστηκαν ή όχι με 0,5 mM DFO για 2 ώρες και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 0,25 mM H₂O₂ για 10 λεπτά. Απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι και στα δείγματα πριν την ηλεκτροφόρηση προστέθηκε ή όχι διθειοθρεϊτόλη (DTT). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε 12% πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι του c-myc (A). Τα ίδια δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν όπως στο (A) αλλά σε 15% πηκτή πολυακρυλαμιδίου (B). Το πείραμα αυτό είναι αντιπροσωπευτικό από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Η παρουσία ιόντων σιδήρου είναι απαραίτητη για την εκτέλεση της αποπτωτικής διαδικασίας

Η παρούσα εργασία ξεκίνησε βασιζόμενη σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, που παρουσίαζαν ενδείξεις ότι τα οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα σιδήρου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου από το H₂O₂ (Barbouti et al., 2007, Tenopoulou et al., 2005). Οι παρατηρήσεις αυτές αποτέλεσαν το έναυσμα για την παρούσα εργασία, η οποία είχε ως στόχο τον ακριβή εντοπισμό των σημείων στα οποία δρουν τα ιόντα σιδήρου καθώς και τη διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού των αντιδράσεων στις οποίες εμπλέκεται ο σίδηρος.

Για τη δέσμευση του σιδήρου χρησιμοποιήθηκε η ένωση δεσφεριοξαμίνη (DFO), η οποία αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη στην κλινική πράξη σιδηροδεσμευτική ένωση σε παθήσεις που σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα σιδήρου και απαιτείται αποσιδήρωση (Aouad et al., 2002; Brittenham, 2003). Η δεσφεριοξαμίνη, που είναι ένα υδρόφιλο μόριο με σχετικά υψηλό μοριακό βάρος (656,8 Da) δεν μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες, αλλά προσλαμβάνεται από τα κύτταρα με ενδοκύτωση υγρής φάσης (fluid phase endocytosis) και μέσω των ενδοσωματίων καταλήγει στα λυσοσώματα και πιθανώς και σε άλλα ενδοκυττάρια διαμερίσματα (Cable and Lloyd, 1999; Doulias et al., 2003; Lloyd et al., 1991). Πρόσφατες πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν ότι ο οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος του κυτταροπλάσματος βρίσκεται σε ισορροπία με τον ενδολυσοσωμικό σίδηρο (Tenopoulou et al., 2005; Tenopoulou et al., 2007). Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι η σταδιακή δέσμευση του σιδήρου στα λυσοσώματα και τα ενδοσώματα από τη δεσφεριοξαμίνη, οδηγεί τελικά στη μεταφορά σιδήρου από το κυτταρόπλασμα στα οργανίδια αυτά. Επομένως, η μείωση του κυτταροπλασματικού σιδήρου, με την πάροδο του χρόνου, θα μπορούσε να προκαλέσει με τον ίδιο τρόπο την μεταφορά/απομάκρυνση σιδήρου και από άλλα κυτταρικά διαμερίσματα.

Στα πρώτα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν διαπιστώθηκε ότι η απομάκρυνση του σιδήρου μέσω προ-επώασης των κυττάρων με δεσφεριοξαμίνη ανέστειλε σε μεγάλο βαθμό τη δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων στο DNA των κυττάρων (Εικόνα 17) αλλά και την εξωτερίκευση της φωσφατιδιλοσερίνης στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Εικόνα 18) υποδηλώνοντας τη σπουδαιότητα των ιόντων σιδήρου στον καταρράκτη της αποπτωτικής διαδικασίας. Η αναστολή, ωστόσο, της απόπτωσης μειωνόταν σταδιακά όσο το διάστημα μεταξύ της έκθεσης των κυττάρων σε H₂O₂ και της προσθήκης DFO μειωνόταν, γεγονός που συμφωνεί με την υπόθεση ότι η δεσφεριοξαμίνη απομακρύνει σταδιακά τα ιόντα σιδήρου από τα διάφορα διαμερίσματα των κυττάρων.

Προσπαθώντας να αποσαφηνίσουμε σε ποιό ακριβώς σημείο της αποπτωτικής διαδικασίας εμπλέκονται τα ιόντα σιδήρου, εξετάσαμε σταδιακά όλα τα γνωστά βήματα της αποπτωτικής διαδικασίας. Παρατηρήσαμε ότι η δέσμευση του σιδήρου, εκτός από τη θραυσματοποίηση του DNA και την εξωτερίκευση της φωσφατιδιλοσερίνης, ανέστειλε την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών (Εικόνα 19) αλλά και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 21B), δύο γεγονότα που αποτελούν καθοριστικά βήματα στο μονοπάτι της απόπτωσης. Είναι γνωστό ότι η απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων, όπως το κυτοχρώμα C στο κυτταρόπλασμα προϋποθέτει τη διάνοιξη πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Zoratti et al., 1995, Green et al., 1998). Κεντρικό ρόλο στον έλεγχο της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Mitochondria Membrane Permeability) διαδραματίζουν τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Ελέγχοντας τις επιπτώσεις του H₂O₂ σε τρία βασικά μέλη των Bcl-2 πρωτεϊνών παρατηρήθηκε ότι ενώ το H₂O₂ δεν επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης της αντι-αποπτωτικής Bcl-2 πρωτεΐνης (Εικόνα 20B), αντίθετα, η έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂ προκάλεσε την ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών Bax και Bid πρωτεϊνών (Εικόνα 20Γ, 20Δ). Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι η μετατόπιση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax στα μιτοχόνδρια (μετά από 1 ώρα) προηγείται της απελευθέρωσης του cyt-C στο κυτταρόπλασμα (στις 3 ώρες), ενώ η σχάση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bid (στις 6 ώρες) φαίνεται να αποτελεί ένα μετεγενέστερο φαινόμενο που προκαλείται σε μια δεύτερη φάση ενίσχυσης του αποπτωτικού σήματος. Θα μπορούσαμε επομένως να υποθέσουμε ότι μετά την ενεργοποίηση της εκτελεστικής κασπάσης-3, ένας δεύτερος κύκλος ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών

λαμβάνει χώρα, οδηγώντας τελικά στη σχάση του Bid (tBid). Το tBid με αυτόν τον τρόπο θα μπορούσε να δράσει ενισχυτικά στη διαδικασία της απόπτωσης (Desagher et al., 1999; Madesh et al., 2002; Wei et al., 2000).

Η διαπίστωση ότι με την απουσία ιόντων σιδήρου αναστάλθηκε η επαγόμενη από το H₂O₂ μετατόπιση του Bax από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια (Εικόνα 21A), που αποτελεί καθοριστικό γεγονός για την μετέπειτα απελευθέρωση του κυτοχρώματος C (Cheng et al., 2001, Lindsten, et al., 2000, Wei et al., 2001), υποδηλώνει ότι τα ιόντα σιδήρου δρουν σε ένα στάδιο του καταρράκτη της αποπτωτικής διαδικασίας που βρίσκεται πριν το επίπεδο των μιτοχονδρίων.

4.2 Ο ρόλος του σιδήρου στην ενεργοποίηση της JNK

Η ενεργοποίηση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax πραγματοποιείται μέσω μιας αλλαγής στη διαμόρφωσή της, η οποία επιτρέπει τη μετατόπιση της στα μιτοχόνδρια (Antonsson et al., 2001; Hsu and Youle, 1998; Mikhailov et al., 2001). Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για αυτή την ενεργοποίηση, με πιο πρόσφατες μελέτες να υποστηρίζουν πως σε συνθήκες οξειδωτικού στρες ρυθμίζεται από τα μέλη της οικογένειας των MAP κινασών και κυρίως από τις JNK και p38 κινάσες (Dhanasekaran and Reddy 2008, Matsuzawa and Ichijo 2005 Bogoyevitch and Kobe 2006, Chang and Karin 2001). Αν και υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποδηλώνουν ότι οι JNK και p38 κινάσες μπορούν να έχουν ως υποστρώματά τους και άλλα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, (Deng et al., 2001; Kharbanda et al., 2000; Kim et al., 2006; Yamamoto et al., 1999) σε μια πρόσφατη ερευνητική εργασία αποδείχθηκε ότι η JNK μπορεί να φωσφορυλιώνει άμεσα την πρωτεΐνη Bax σε ένα κατάλοιπο θρεονίνης (Thr165), προκαλώντας την ενεργοποίηση και την άμεση μετατόπισή της στα μιτοχόνδρια (Kim et al., 2006).

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιώντας έναν εξειδικευμένο αναστολέα της JNK (SP600125), διαπιστώθηκε κατ' αρχήν ότι η προ-επώση των κυττάρων με τον αναστολέα αυτό ανέστειλε σε σημαντικό βαθμό την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτοσόλιο αλλά και τη δημιουργία θραυσμάτων στο DNA των κυττάρων (Εικόνα 22A, 23). Αντίθετα, για την κινάση p38 δεν κατέστη εφικτή η αξιολόγηση της συμμετοχής της, καθώς ο αναστολέας της κινάσης p38 (SB202190) από μόνος τους ήταν πολύ τοξικός (Εικόνα 22B). Τέλος με τον αναστολέα της

ERK1/2 (PB98059) δεν παρατηρήθηκε αξιόλογη προστασία στο DNA των κυττάρων (Εικόνα 22Γ). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών υποδηλώνουν ότι τουλάχιστον η JNK εμπλέκεται στο μηχανισμό πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και συμφωνούν με άλλες βιβλιογραφικές αναφορές που υποστηρίζουν ότι η JNK αποτελεί κεντρικό σηματοδοτικό μόριο σε πορείες μεταγωγής σημάτων που σχετίζονται με στρεσογόνες καταστάσεις (Cano and Mahadevan, 1995; Chen and Tan, 2000; Chen et al., 1996; Sluss et al., 1994; Tournier et al., 2000). Εξετάζοντας στη συνέχεια την κινητική των επιπέδων φωσφορυλίωσης της JNK, διαπιστώθηκε ότι το H₂O₂ προκάλεσε μια απότομη αύξηση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της JNK από τα πρώτα 30 λεπτά. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε μια μείωση, αλλά η JNK παρέμεινε φωσφορυλιωμένη καθόλη τη διάρκεια της αποπτωτικής διαδικασίας (Εικόνα 24Α). Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με τη γενικότερη άποψη που υποστηρίζει ότι η παρατεταμένη φωσφορυλίωση της JNK οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο, ενώ η παροδική ενεργοποίησή της σχετίζεται με την επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Chen and Tan, 2000). Το γεγονός ότι η απομάκρυνση των ιόντων σιδήρου πριν από την έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂ ανέστειλε σημαντικά τη φωσφορυλίωση της JNK αποδεικνύει ότι ο ενδοκυττάριος σίδηρος εμπλέκεται στο μοριακό μηχανισμό ενεργοποίησής της (Εικόνα 24Β). Επομένως για την περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου τα ιόντα σιδήρου εμπλέκονται στον μηχανισμό ενεργοποίησης της JNK, έπρεπε να εξεταστεί αρχικά ο ρόλος και η δραστηριότητα των ανοδικών κινασών της.

4.3 Ο ρόλος του σιδήρου στην ενεργοποίηση της ASK1

Η ASK1 (Apoptosis Signal regulating Kinase-1) θεωρείται ότι αποτελεί τη σημαντικότερη MAP3 κινάση όσον αφορά την φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της JNK σε στρεσογόνες καταστάσεις (Ichijo et al., 1997; Wang et al., 1996). Το οξειδωτικό στρες, το στρες ενδοπλασματικού δικτύου (Nishitoh et al., 2002; Urano et al., 2000), τα αντικαρκινικά φάρμακα (Saeki et al., 2002), η ιονίζουσα ακτινοβολία (Van Laethem et al., 2006) και η δράση κυτοκινών, όπως του TNF- α (Gotoh and Cooper, 1998), μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση της ASK1. Έχει δειχθεί ότι η ASK1 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στους μοριακούς μηχανισμούς πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου καθώς η υπερέκφραση του αγρίου τύπου ή η συνεχής

ενεργοποίησή της μπορούν να προκαλέσουν αποπτωτικό θάνατο μέσω της πορείας των μιτοχονδρίων (Hatai et al., 2000; Kanamoto et al., 2000; Tobiume et al., 2001). Αντίστοιχα, κύτταρα στα οποία δεν εκφράζεται η ASK1 παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα στον κυτταρικό θάνατο (Tobiume et al., 2001).

Εξετάζοντας την κινητική των επιπέδων φωσφορυλίωσης της ASK1 διαπιστώθηκε ότι το H₂O₂ προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της ASK1 μόλις από τα πρώτα 15 λεπτά, παρουσιάζοντας μια μέγιστη τιμή στα 30 λεπτά, η οποία στη συνέχεια μειώθηκε. Δέσμευση του ενδοκυττάριου σιδήρου πριν από την έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂ ανέστειλε τη φωσφορυλίωσή της (Εικόνα 25), υποδηλώνοντας ότι ο σίδηρος είναι απαραίτητος στο μηχανισμό ενεργοποίησης της ASK1. Καθώς ήταν γνωστό ότι η ενεργοποίηση της ASK1 εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση ενός από τους πιο βασικούς της αναστολείς, της θειορεδοξίνης-1 (Trx-1) (Saitoh et al., 1998), εξετάστηκε η αλληλεπίδραση αυτών των πρωτεϊνών. Διαπιστώθηκε ότι ενώ το H₂O₂ προκάλεσε την απομάκρυνση της Trx-1 από το σύμπλοκο της ASK1, απουσία ιόντων σιδήρου ένα σημαντικό μέρος της Trx-1 παρέμεινε συνδεδεμένο με την ASK1 (Εικόνα 26). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η οξείδωση και η απομάκρυνση της Trx-1 από το σύμπλοκο της ASK1 διαμεσολαβείται από την παρουσία ιόντων σιδήρου. Αν και υπάρχουν αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι η Trx-1 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες οξειδώνεται και απομακρύνεται από το σύμπλοκο της ASK1 (Fujino et al., 2007; Noguchi et al., 2005; Saitoh et al., 1998), είναι η πρώτη φορά που αποδεικνύεται ότι τα ιόντα σιδήρου μπορούν να επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση της Trx-1.

Ωστόσο, εκτός από την Trx-1 έχει βρεθεί ότι υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες οι οποίες μπορούν να δρουν ως αναστολείς στο σύμπλοκο που σχηματίζει η ASK1 υπό φυσιολογικές συνθήκες στο κυτταρόπλασμα (Noguchi et al., 2005). Παραδείγματος χάριν, η γλουταρεδοξίνη (Grx-1) (Song and Lee, 2003; Song et al., 2002), η οποία ανήκει στην ίδια οικογένεια με την Trx-1 (thiol-disulphide oxidoreductase family) (Lillig and Holmgren 2007) έχει διαπιστωθεί ότι σε συνθήκες οξειδωτικού στρες οξειδώνεται και απομακρύνεται από το σύμπλοκο της ASK-1. Αν και δεν έχουν γίνει αντίστοιχα πειράματα, όπως στην περίπτωση της Trx-1, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τα ιόντα σιδήρου, με τον ίδιο τρόπο, παρουσία H₂O₂ θα μπορούσαν να επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση και της Grx-1.

4.4 Επιπτώσεις του H₂O₂ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση της φωσφατάσης DUSP1

Εκτός από την ASK1 η οποία συμμετέχει στον καταρράκτη φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης της JNK, κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργότητας της JNK κατέχουν οι διπλής εξειδίκευσης φωσφατάσες της (Dual Specificity Phosphatase, DUSPs), οι οποίες ελέγχουν την ταχύτητα αποφωσφορυλίωσής της. Μια από τις πιο σημαντικές φωσφατάσες που έχει δείχθει ότι είναι υπεύθυνες για την αποφωσφορυλίωση της JNK, είναι η DUSP1 (Teng et al., 2007).

Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε η οξειδοαναγωγική κατάσταση της DUSP1 σε δυο τύπους κυττάρων, κύτταρα Jurkat (T-λεμφοκυτταρική σειρά) και ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE. Διαπιστώθηκε ότι η DUSP1 είναι επιρρεπής σε οξειδωτικές τροποποιήσεις καθώς παρουσία H₂O₂ ένα μέρος της οξειδώνεται δημιουργώντας δισουλφιδικό (ούς) δεσμό(ούς) με μια ή περισσότερες άγνωστες πρωτεΐνες (Εικόνα 28, 29). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, παρουσίασε το γεγονός ότι η οξείδωση της DUSP1 αποτελεί ένα πολύ πρώιμο γεγονός στην αποπτωτική διαδικασία καθώς χρονικά η εμφάνιση του οξειδωμένου συμπλόκου (δισουλφιδικός δεσμός) παρατηρήθηκε μόλις από τα πρώτα 10 λεπτά έκθεσης σε H₂O₂ τόσο στα κύτταρα Jurkat όσο και στα κύτταρα HUVE (Εικόνα 28). Στα κύτταρα Jurkat η ένταση της μπάντας του οξειδωμένου συμπλόκου παρουσίασε ένα μέγιστο στα 30 λεπτά έκθεσης σε H₂O₂, το οποίο μετά απο μια ώρα χάθηκε, ενώ στα HUVEC υπήρχε μια σταδιακή αύξηση έως την 1^η ώρα, η οποία στη συνέχεια μειώθηκε μεν αλλά διατηρήθηκε μέχρι και τις 3 ώρες (Εικόνα 28). Οι διαφορές στην κινητική της εμφάνισης του οξειδωμένου συμπλόκου της DUSP1 στα δύο είδη κυττάρων πρέπει να οφείλονται, τόσο στο ότι ο αριθμός των κυττάρων ήταν διαφορετικός όσο και στο ότι η ταχύτητα απομάκρυνσης του H₂O₂ διαφέρει στους διάφορους τύπους κυττάρων. Εντούτοις και στις δύο κυτταρικές σειρές παρατηρήθηκε ότι σταδιακά με την πάροδο του χρόνου το οξειδωμένο σύμπλοκο της DUSP1 εξαφανίστηκε, γεγονός που υποδηλώνει ότι η οξειδωτική τροποποίηση που υφίσταται η DUSP1 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες αποτελεί μια αντιστρεπτή τροποποίηση. Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι ενδοκυττάρια αναγωγικά ένζυμα ανάγουν το οξειδωμένο σύμπλοκο της DUSP1. Γνωρίζοντας ότι το H₂O₂ απομακρύνεται με την πάροδο του χρόνου, ακολουθώντας κινητική πρώτης τάξης, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι παρουσία H₂O₂ ένα μέρος της DUSP1 οξειδώνεται, όταν όμως το H₂O₂ έχει απομακρυνθεί τότε

η πρωτεΐνη ανάγεται ξανά. Από την άλλη πλευρά, μια άλλη εκδοχή είναι ότι πιθανώς η DUSP1 όταν οξειδώνεται οδηγείται προς αποικοδόμηση. Ωστόσο, σε άλλες μελέτες έχειδειχθεί ότι η προσθήκη αναστολέων του πρωτεασώματος στο καλλιεργητικό υλικό, δεν επηρέασε την επαναφορά οξειδωμένων φωσφατάσων στην ανηγμένη τους μορφή (Kamata et al., 2005). Αντίθετα, χρησιμοποιώντας αναστολείς της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης (buthioninesulfoximine; BSO) ή της αναγωγάσης της θειορεδοξίνης (2,4-dinitro-1-chlorobenzene, DNCB) διαπιστώθηκε ότι οξειδωμένες φωσφατάσες δεν επανήλθαν στην ανηγμένη τους μορφή (Lee et al., 2002). Βασιζόμενοι στις παραπάνω παρατηρήσεις, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι και στην περίπτωση της DUSP1, το πιο πιθανό είναι ότι ενδοκυττάρια ένζυμα είναι υπεύθυνα για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών και την επαναφορά της DUSP1 στην λειτουργική της μορφή.

Όσον αφορά την πρωτεΐνη ή τις πρωτεΐνες με τις οποίες η DUSP1 σχηματίζει αυτό το υψηλού μοριακού βάρους σύμπλοκο, είναι πιθανόν οι πρωτεΐνες αυτές να βρίσκονται σε επαφή με τη DUSP1 και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Δηλαδή το σύμπλοκο να προϋπάρχει, με την παρουσία όμως H_2O_2 μια κυστεΐνη να οξειδώνεται με αποτέλεσμα να σχηματίζονται δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ της DUSP1 και αυτών των πρωτεϊνών. Αν και είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω πειράματα για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που μετέχουν στο οξειδωμένο σύμπλοκο της DUSP1, βασιζόμενοι στην παρατηρούμενη διαφορά στα μοριακά βάρη, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι το οξειδωμένο σύμπλοκο της DUSP1 είτε αποτελείται από ολιγομερή μόρια (τετραμερή) της ίδιας της φωσφατάσης, είτε ότι η DUSP1 προσδέεται σε άλλες πρωτεΐνες, πιθανώς «scaffold proteins» (σύμπλοκα μεταξύ των MAP3K, MAP2K και MAPK) σχηματίζοντας υψηλού μοριακού βάρους δομές (Zama, Aoki et al., 2002a, Zama, Aoki et al., 2002b, (Dhanasekaran et al., 2007; Willoughby et al., 2003).

Όταν τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με αδενοϊούς που εξέφραζαν είτε την αγρίου τύπου DUSP1, είτε την καταλυτικά ανενεργή μορφή της (AdDUSP1/CS), στην οποία η κυστεΐνη του ενεργού της κέντρου (Cys258) είχε αντικατασταθεί από ένα κατάλοιπο σερίνης, διαπιστώθηκε ότι και στις δύο περιπτώσεις, παρουσία H_2O_2 , η DUSP1 οξειδώνεται (Εικόνα 31A). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η κυστεΐνη του ενεργού κέντρου της DUSP1 δεν αποτελεί την μοναδική κυστεΐνη που μπορεί να υπόκειται σε οξειδωτική τροποποίηση. Φαίνεται ότι και άλλες κυστεΐνες στο μόριο της DUSP1, εκτός από αυτή του ενεργού της κέντρου, μπορεί να συνδέονται με

δισουλφιδικούς δεσμούς παρουσία H_2O_2 . Ωστόσο, θα πρέπει να επισημανθεί ότι το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τα αποτελέσματα άλλης ερευνητικής ομάδας, η οποία υποστηρίζει ότι με την αντικατάσταση της κυστεΐνης του ενεργού κέντρου (Cys258) της DUSP1, αναστέλλεται πλήρως η επαγόμενη από το H_2O_2 οξείδωση της φωσφατάσης (Kamata et al., 2005). Αν και δεν μπορούμε προς το παρόν να δώσουμε μια σαφή ερμηνεία για τα αντίθετα αυτά αποτελέσματα θα πρέπει να επισημανθεί ότι εκτός από το γεγονός ότι η συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε επιθηλιακά κύτταρα HeLa, οι συγκεντρώσεις H_2O_2 που χρησιμοποιήσαν ήταν πολύ μεγαλύτερες (3 και 10 mM) σε σχέση με τα 0,1 και 0,25mM H_2O_2 που χρησιμοποιήσαμε στο δικό μας πειραματικό μοντέλο. Επιπλέον, εξετάζοντας προσεκτικότερα την αλληλουχία των αμινοξέων στο μόριο της DUSP1, εκτός από την κυστεΐνη του ενεργού της κέντρου ($C^{258}X_5R$) η οποία είναι γνωστό ότι είναι ιδιαίτερα επιρρεπής σε οξειδωτικές τροποποιήσεις, παρόμοια αλληλουχία (CX_5R) παρατηρήσαμε και σε δύο άλλες περιοχές στο μόριο της DUSP1 (Cys269 και Cys24). Κατά συνέπεια, η εμφάνιση του νέου οξειδωμένου συμπλόκου που σχηματίστηκε με την αντικατάσταση της Cys258 είναι πιθανόν να οφείλεται στην οξείδωση των Cys269 και/ή Cys24.

Μια δεύτερη αλλά εξίσου σημαντική παρατήρηση στο πείραμα αυτό ήταν ότι μετά την έκθεση σε H_2O_2 τόσο στα κύτταρα που είχε υπερεκφραστεί η αγρίου τύπου DUSP1(AdDUSP1wt), όσο και η καταλυτικά ανενεργή μορφή της (AdDUSP1/CS), εμφανίστηκε μια ακόμη μάλιστα λίγο πιο κάτω από την DUSP1 (Εικόνα 31B), η οποία χανόταν όταν σε αυτά τα δείγματα πριν από την ηλεκτροφόρηση προστέθηκε διθειοθρεϊτόλη. Η εμφάνιση αυτής της μάλιστα δεν είχε παρατηρηθεί εξετάζοντας τα ενδογενή επίπεδα της φωσφατάσης. Μια εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι η μάλιστα αυτή αποτελεί έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό που πιθανά σχηματίζει η DUSP1 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, μόνο όταν υπερεκφράζεται, με αποτέλεσμα κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων να «τρέχει /μετακινείται» λίγο πιο κάτω καθώς έχει σχηματίσει μια πιο συμπαγή δομή. Παρόμοιο φαινόμενο έχει αναφερθεί και σε μια μελέτη της ερευνητικής ομάδας του S.G Rhee (Lee et al., 2002), στην οποία εξετάζοντας με την ίδια τεχνική (non-reducing SDS-PAGE) την οξειδοαναγωγική κατάσταση της τυροσινικής φωσφατάσης PTEN, διαπιστώθηκε ότι παρουσία H_2O_2 εκτός από την ανηγμένη μορφή της φωσφατάσης, ανιχνεύθηκε και μια άλλη μάλιστα λίγο χαμηλότερα. Περαιτέρω μελέτες με τη χρήση σημειακών μεταλλάξεων και φασματομετρίας μάζας απέδειξαν ότι η εμφάνιση αυτής της

μπάντας οφειλόταν στο σχηματισμό ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ της κυστεΐνης του ενεργού κέντρου (Cys124) της PTEN και της Cys71 (Lee et al., 2002).

4.5 Τα ιόντα σιδήρου επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση της φωσφατάσης DUSP1

Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, υπάρχει μεγάλος αριθμός πειραματικών δεδομένων, που τεκμηριώνουν ότι οι οξειδώσεις τυροσινικών φωσφατασών διαδραματίζουν κομβικό ρόλο σε πορείες μεταγωγής σημάτων καθώς η οξείδωσή τους προκαλεί την απενεργοποίηση και αναστολή της δράσης τους (Caselli et al., 1998; Chiarugi et al., 2001; Lee et al., 1998b; Lee et al., 2002; Meng et al., 2002; Savitsky and Finkel, 2002). Παρά την πλούσια βιβλιογραφία που υπάρχει γύρω από το ρόλο και τις συνέπειες που επιφέρουν οι οξειδωτικές τροποποιήσεις κυστεϊνικών καταλοίπων των τυροσινικών φωσφατασών από το H₂O₂, οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους πραγματοποιούνται οι τροποποιήσεις αυτών των σουλφιδρικών ομάδων παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι.

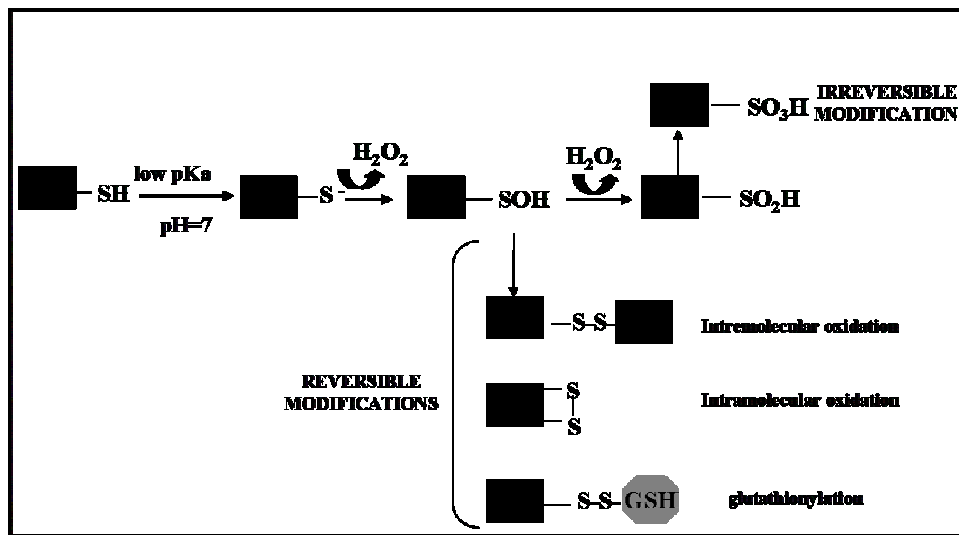
Στην συγκεκριμένη εργασία διαπιστώθηκε ότι η απομάκρυνση του σιδήρου μέσω προ-επώασης των κυττάρων με DFO ανέστειλε σε σημαντικό βαθμό την οξείδωση της DUSP1 όταν ελέγχθηκαν τα ενδογενή της επίπεδα (Εικόνα30), όσο και όταν στα κύτταρα είχε υπερεκφραστεί η αγρίου τύπου μορφή της (AdDUSP1wt) (Εικόνα 31A). Η απομάκρυνση του σιδήρου από τα κύτταρα ανέστειλε και την εμφάνιση της μπάντας που παρατηρήθηκε κάτω από την DUSP1 (πιθανός ενδομοριακός δεσμός) (Εικόνα 31B). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι για την αποτελεσματική οξείδωση της DUSP1 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες απαιτείται η ύπαρξη ιόντων σιδήρου. Αντίθετα όμως, διαπιστώθηκε ότι ενώ τα ιόντα σιδήρου εμπλέκονται στο μηχανισμό μέσω του οποίου το H₂O₂ προκαλεί την οξείδωση της DUSP1, όταν αντικαθίσταται η κυστεΐνη του ενεργού της κέντρου (AdDUSP1/CS) φαίνεται ότι η δέσμευση του σιδήρου δεν μπορεί να αναστείλει το σχηματισμό του νέου οξειδωμένου συμπλόκου που δημιουργείται (Εικόνα 31B). Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι, είτε η δεσφεριοξαμίνη δεν είχε την ικανότητα να δεσμεύσει τα ιόντα σιδήρου που είναι υπεύθυνα για την κατάλυση της συγκεκριμένης οξείδωσης, είτε ότι τα ιόντα σιδήρου δε μετέχουν στον μηχανισμό μέσω του οποίου το H₂O₂ προκαλεί τη δημιουργία αυτού του νέου οξειδωμένο σύμπλοκου της DUSP1.

Η παρατήρηση ότι με τη δέσμευση των ιόντων σιδήρου αναστάλθηκε η επαγόμενη από το H_2O_2 οξείδωση της DUSP1, είναι ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον αποτέλεσμα καθώς για πρώτη φορά φαίνεται ότι η ενδοκυττάρια διαθεσιμότητα των ιόντων σιδήρου αποτελεί αποφασιστικό παράγοντα στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης της τυροσινικής φωσφατάσης DUSP1. Φαίνεται λοιπόν ότι, όπως και στην περίπτωση της Trx-1, τα ιόντα σιδήρου εμπλέκονται στο μηχανισμό μέσω του οποίου το H_2O_2 προκαλεί οξειδωτικές τροποποιήσεις. Παρόλο που στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε μόνο η οξειδοαναγωγική κατάσταση της DUSP1, καθώς όλες οι τυροσινικές φωσφατάσες περιέχουν τουλάχιστον μια επιρρεπή σε οξειδωτικές τροποποιήσεις κυστεΐνη, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η δέσμευση των ιόντων σιδήρου θα οδηγούσε σε παρόμοια αποτελέσματα μελετώντας και άλλες αντίστοιχες φωσφατάσες της JNK.

4.6 Προτεινόμενος μηχανισμός οξείδωσης σουλφιδριλικών ομάδων

Μέχρι πρόσφατα, οι ΔΜΟ και ιδιαίτερα το H_2O_2 , είχαν συσχετιστεί είτε με ανεπιθύμητα προϊόντα που παράγονται κατά το μεταβολισμό στους αερόβιους οργανισμούς, είτε με αντιμικροβιακούς παράγοντες που παράγονται από τα φαγοκύτταρα (Lambeth, 2004). Τα τελευταία χρόνια έγινε κατανοητό ότι τα ενδοκυττάρια επίπεδα του H_2O_2 παίζουν αποφασιστικό ρόλο στη διαδικασία μεταγωγής του σήματος (signal transduction). Η ικανότητα του H_2O_2 να ρυθμίζει τη λειτουργία κεντρικών σηματοδοτικών μορίων (μεταγραφικοί παράγοντες, πρωτεΐνες κινάσες/φωσφατάσες κ.ά) μέσω οξειδωτικών τροποποιήσεων σουλφιδριλικών ομάδων (-SH), καθιστούν το H_2O_2 ένα ιδιαίτερα σημαντικό μόριο σε πορείες μεταγωγής σημάτων. Οι σουλφιδριλικές ομάδες που περιέχονται στα μόρια αυτά μπορεί να υπόκεινται σε οξειδωτικές τροποποιήσεις με αποτέλεσμα την ενζυμική τους απενεργοποίηση (Chiarugi and Buricchi, 2007). Η απομάκρυνση του H_2O_2 μέσω της δράσης ενζύμων οδηγεί στην επαναγωγή των μορίων αυτών στην αρχική τους κατάσταση (Cys-SH) και καθιστά τις αντίστοιχες πρωτεΐνες λειτουργικές. Παρόλο που οι περισσότερες πρωτεΐνες περιέχουν αρκετά κατάλοιπα κυστεϊνών στο μόριο τους, το H_2O_2 δεν έχει την ικανότητα να οξειδώνει οποιαδήποτε από αυτές, αλλά δρα επιλεκτικά μόνο σε ορισμένες (Εικόνα 32). Κεντρικό ρόλο στο αν μια κυστεΐνη θα οξειδωθεί, παίζει η παρουσία θετικά φορτισμένων αμινοξέων στο μικροπεριβάλλον της, όπως για παράδειγμα καταλοίπων αργινίνης, λυσίνης και

ιστιδίνης. Το pKa των περισσοτέρων κυστεϊνών μιας πρωτεΐνης είναι περίπου 8.5, στην περίπτωση όμως που μία κυστεΐνη περιβάλλεται από θετικά φορτισμένα αμινοξέα το pKa της σουλφυδρυλικής αυτής ομάδας μειώνεται, με συνέπεια σε φυσιολογικό pH η ομάδα αυτή να αποπρωτονιώνεται (Lohse et al., 1997; Zhang and Dixon, 1993). Στην περίπτωση αυτή θεωρείται ότι η συγκεκριμένη κυστεΐνη είναι ευάλωτη στην οξειδωτική δράση του H_2O_2 .



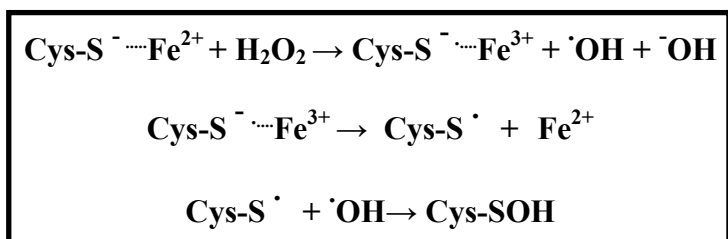
Εικόνα 32: Οξειδωτικές τροποποιήσεις σουλφιδρυλικών ομάδων

Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 32, η αποπρωτονιωμένη και ευάλωτη κυστεΐνη μπορεί αρχικά να οξειδωθεί προς σουλφενικό οξύ (-SOH). Το σουλφενικό οξύ, το οποίο είναι ένα ιδιαίτερα ασταθές ενδιάμεσο, μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω προς σουλφινικό(-SO₂H) ή σουλφονικό οξύ (-SO₃H), εκ των οποίων το τελευταίο θεωρείται μέχρι στιγμής ως μία μη αντιστρεπτή τροποποίηση. Αντίθετα όμως πρωτεΐνες που έχουν οξειδωθεί προς σουλφενικά οξέα (-SOH), μπορούν στη συνέχεια να σχηματίσουν δισουλφιδικούς δεσμούς είτε διαμοριακούς (intermolecular disulfides) με μια άλλη πρωτεΐνη οδηγώντας στο σχηματισμό διμερών ή πολυμερών, είτε ενδομοριακούς δεσμούς (intramolecular disulfides) με μια άλλη θειλική ομάδα του ίδιου του μορίου (Blanchetot et al., 2002; Caselli et al., 1998; Chiarugi et al., 2001; Lee et al., 2002; Xiong et al., 2003). Επιπροσθέτως, έχει δείχθει ότι οξειδωμένες πρωτεΐνες (-SOH) μπορούν να δημιουργήσουν μεικτά δισουλφίδια GSH-πρωτεϊνών (protein-GSH mixed disulfides) μια τροποποίηση γνωστή και ως S-γλουταθειονυλίωση (Barrett et al., 1999). Τέτοιου είδους οξειδώσεις αποτελούν τους βασικούς μηχανισμούς μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η αποφυγή περαιτέρω και μη

αντιστρεπτών οξειδώσεων (Chiarugi and Buricchi, 2007; Chiarugi and Cirri, 2003). Αν και υπάρχουν πολλές μελέτες με επίκεντρο το ρόλο και τις συνέπειες που επιφέρουν οι οξειδωτικές τροποποιήσεις κυστεϊνικών καταλοίπων στη μεταβίβαση μηνυμάτων, οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους πραγματοποιούνται οι τροποποιήσεις αυτών των σουλφιδριλικών ομάδων παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι.

Τόσο η θειορεδοξίνη-1 όσο και η DUSP1 είναι πρωτεΐνες, οι οποίες είναι γνωστό ότι μπορούν να υπόκεινται σε οξειδωτικές τροποποιήσεις σε συνθήκες οξειδωτικού στρες καθώς στο ενεργό τους κέντρο περιέχουν σουλφιδριλικές ομάδες οι οποίες είναι επιρρεπείς σε οξειδωτικές τροποποιήσεις. Το pKa της Cys32 του καταλυτικού κέντρου της Trx-1(-Cys³²-Gly-Pro-Cys³⁵) έχειδειχθεί ότι είναι περίπου 2 μονάδες πιο κάτω από αυτό των περισσοτέρων κυστεϊνών μιας πρωτεΐνης (Holmgren, 1995; Kallis and Holmgren, 1980; Weichsel et al., 1996) Αντίστοιχα, η DUSP1 αλλά και όλα τα μέλη των τυροσινικών φωσφατασών διπλής εξειδίκευσης είναι γνωστό ότι στο ενεργό τους κέντρο «CX₅R» υπάρχει μία ιδιαίτερα ευάλωτη σε οξειδωτικές τροποποιήσεις κυστεϊνή (pKa=4,7 με 5,6) (Denu and Dixon, 1998).

Καθώς επομένως διαπιστώθηκε ότι με την απουσία ιόντων σιδήρου αναστάλθηκε τόσο η επαγόμενη από το H₂O₂ οξείδωση και απομάκρυνση της Trx-1 από το σύμπλοκο της ASK1, όσο και η οξείδωση της DUSP1, φαίνεται ότι το H₂O₂ χρειάζεται ιόντα σιδήρου για να μπορέσει να προκαλέσει αυτές τις οξειδώσεις. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός αντιδράσεων παρουσιάζεται στην Εικόνα 33.



Εικόνα 33: Προτεινόμενος μηχανισμός οξείδωσης σουλφιδριλικών ομάδων

Ο σίδηρος λόγω του θετικού του φορτίου πιθανόν προσελκύεται στις αρνητικά φορτισμένες σουλφιδριλικές ομάδες (αποπρωτονιωμένες) των Cys αυτών των μορίων και καθώς αυξάνουν τα επίπεδα H₂O₂ μέσα στα κύτταρα, παρουσία ιόντων σιδήρου πραγματοποιούνται αντιδράσεις τύπου Fenton, με αποτέλεσμα οι δραστικές $\cdot\text{OH}$ ή οι ενδιάμεσοι οξειδωτικοί παράγοντες, που προκύπτουν από την αντίδραση αυτή να οξειδώνουν τις σουλφιδριλικές ομάδες τους. Τέτοιου είδους

οξειδώσεις θα μπορούσαν να εξηγήσουν την απαίτηση της παρουσίας ιόντων σιδήρου για την εκτέλεση των αντιδράσεων αυτών.

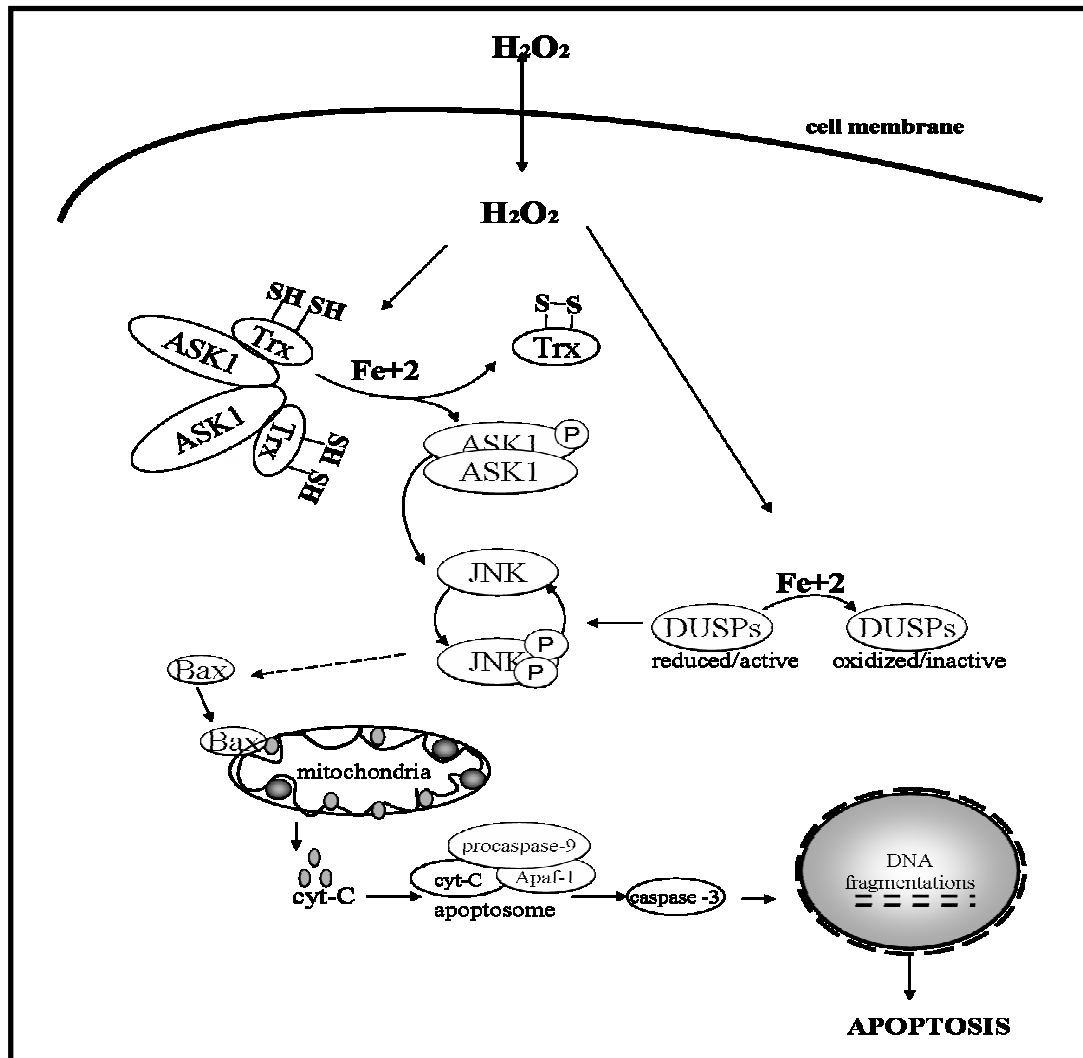
Φαίνεται επομένως ότι η καταλυόμενη από ιόντα σιδήρου οξείδωση ευαίσθητων σουλφιδρικών ομάδων πρωτεϊνών, αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό μέσω του οποίου το H_2O_2 δρα ως μεταγωγέας σημάτων επηρεάζοντας την οξειδοαναγωγική κατάσταση κεντρικών σηματοδοτικών μορίων.

4.7 Προτεινόμενος ρόλος των ιόντων σιδήρου στον μοριακό μηχανισμό πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου από το H_2O_2

Μελετώντας όλα τα βήματα της αποπτωτικής διαδικασίας, διαπιστώθηκε ότι τα ιόντα σιδήρου μετέχουν τόσο στο μηχανισμό μέσω του οποίου το H_2O_2 επηρεάζει την οξειδοαναγωγική κατάσταση της θειορεδοξίνης-1, η οποία αποτελεί έναν από τους βασικότερους αναστολείς της ASK1 (ανοδική κίνηση της JNK), όσο και την οξειδοαναγωγική κατάσταση της DUSP1 (μια από τις σημαντικότερες φωσφατάσες της JNK). Παρόλο που στην συγκεκριμένη μελέτη ελέγχθηκε μόνο η οξειδοαναγωγική κατάσταση της DUSP1, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι το H_2O_2 μέσω της παρουσίας ιόντων σιδήρου, θα μπορούσε να προκαλέσει με τον ίδιο τρόπο την οξείδωση και άλλων αντίστοιχων τυροσινικών φωσφατασών της JNK.

Γνωρίζοντας από την βιβλιογραφία ότι η οξείδωση τυροσινικών φωσφατασών προκαλεί την ενζυμική τους απενεργοποίηση (Caselli et al., 1998; Lee et al., 1998b; Lee et al., 2002; Meng et al., 2002; Savitsky and Finkel, 2002) είναι πολύ πιθανόν και στη δική μας περίπτωση η οξείδωση της DUSP1 να έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίησή της. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται και σε άλλες *in vitro* μελέτες στις οποίες μετρώντας σε συνθήκες οξειδωτικού στρες την ενεργότητα άλλων τυροσινικών φωσφατασών της JNK διαπιστώθηκε αναστολή της ενζυμικής τους δραστηριότητας (Denu and Tanner, 1998; Kamata et al., 2005). Βέβαια, είναι απαραίτητα περαιτέρω πειράματα με στόχο την διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού απενεργοποίησης των τυροσινικών φωσφατασών.

Βασιζόμενοι στις παραπάνω παρατηρήσεις, ένα προτεινόμενο μοντέλο δράσης των ιόντων σιδήρου στο μονοπάτι της αποπτωτικής διαδικασίας απεικονίζεται στην Εικόνα 34.



Εικόνα 34: Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης των ιόντων σιδήρου στον μοριακό μηχανισμό πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες

Η καταλύμενη από ιόντα σιδήρου ενεργοποίηση της ASK1 παρουσία H_2O_2 και η ταυτόχρονη οξείδωση/απενεργοποίηση τυροσινικών φωσφατασών της JNK φαίνεται να δρουν συνεργιστικά προκαλώντας την παρατεταμένη φωσφορυλίωση της JNK και οδηγώντας τελικά στην ενεργοποίηση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax. Η πρωτεΐνη Bax απομακρύνεται από το κυτταρόπλασμα, εισέρχεται στην εξωτερική μιτοχondριακή μεμβράνη, ολιγομερίζεται προκαλώντας τη διάνοιξη πόρων στη μεμβράνη των μιτοχondρίων (Antonsson et al., 2001; Hsu and Youle, 1998;

Mikhailov et al., 2001). Η μετέπειτα απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα, η δημιουργία του αποπτωσώματος και η ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών οδηγούν τελικά στη θραυσματοποίηση του DNA και στον αποπτωτικό θάνατο (Εικόνα 34).

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ενδοκυττάρια διαθεσιμότητα των ιόντων σιδήρου αποτελεί αποφασιστικό παράγοντα για τη δράση του H_2O_2 ως δεύτερου διαμεσολαβητή και στη ρύθμιση της δράσης πρωτεϊνών μέσω οξειδώσεων ευαίσθητων κυστεϊνικών καταλοίπων τους. Η σημαντικότητα των ιόντων σιδήρου έχει επιβεβαιωθεί και σε πρόσφατες πειραματικές μελέτες στο εργαστήριο μας, όπου αποδείχθηκε ότι οι αλλαγές στην οξειδωτική κατάσταση των κυττάρων επηρεάζουν τη διαμερισματοποίηση και τη διαθεσιμότητα του σιδήρου (Tenopoulou et al.; 2005, 2007). Επιπλέον, σε μια άλλη πρόσφατη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας διαπιστώθηκε ότι η οξείδωση και απενεργοποίηση της προκασπάσης-9 από το H_2O_2 , επίσης διαμεσολαβείται από την παρουσία ιόντων σιδήρου (Barbouti et al., 2007). Η πιθανή εμπλοκή των ιόντων σιδήρου σε πορείες μεταγωγής σημάτων έχει προταθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες (Pham et al., 2004; Xiong et al., 2003; Yoshioka et al., 2006), όμως, στην παρούσα εργασία αποδείχθηκε για πρώτη φορά η άμεση εμπλοκή του σιδήρου και το ακριβές σημείο δράσης του.

Αντικείμενο περαιτέρω μελέτης αποτελεί η εμβάθυνση και η διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού μέσω του οποίου τα ιόντα σιδήρου επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση και δραστηριότητα κεντρικών σηματοδοτικών μορίων όχι μόνο στην αποπτωτική διαδικασία αλλά ίσως και σε άλλες πορείες μεταγωγής σημάτων.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτη των μοριακών μηχανισμών πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου σε κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2 : Ο ρόλος των ιόντων σιδήρου

Η ιδιότητα των ιόντων σιδήρου να αλλάζουν την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση είναι ένα γεγονός που τους προσδίδει από τη μία πλευρά μία προνομιακή θέση στη ζώσα ύλη αλλά από την άλλη τα καθιστά πιθανές πηγές κινδύνου. Για τον λόγο αυτό, η φύση έχει προβλέψει ούτως ώστε το μεγαλύτερο μέρος του ενδοκυττάριου σιδήρου να βρίσκεται στενά συνδεδεμένο σε πρωτεΐνες με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται η αντίδρασή του με το H_2O_2 . Εντούτοις, ένα μικρό μέρος του σιδήρου θεωρείται ότι ευρίσκεται στα κύτταρα χαλαρά συνδεδεμένο σε διάφορα ενδοκυττάρια μόρια και είναι άμεσα διαθέσιμο στο κύτταρο για την κάλυψη των αναγκών του. Το μέρος αυτό του σιδήρου καλείται “οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος” και θεωρείται ικανό να αντιδρά με H_2O_2 με συνέπεια τη δημιουργία των εξαιρετικά δραστικών ριζών υδροξυλίου (OH), οι οποίες δεν προλαβαίνουν να διαχυθούν αλλά αντιδρούν ακαριαία και οξειδώνουν όλα τα κυτταρικά συστατικά.

Πέρα όμως από την τοξική δράση που παρουσιάζει το H_2O_2 , τα τελευταία χρόνια έχει γίνει κατανοητό ότι η ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική κατάσταση αποτελεί το βασικό ρυθμιστή της «τύχης» του κυττάρου καθώς αλλαγές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία μπορούν να επηρεάσουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Ωστόσο, αν και ο ρόλος του H_2O_2 ως δευτέρου διαμεσολαβητή έχει μελετηθεί εκτενώς και είναι κοινώς αποδεκτό ότι παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών διεργασιών, από την άλλη πλευρά, ελάχιστες είναι μέχρι στιγμής οι διαθέσιμες αναφορές πάνω στο ρόλο (αν υπάρχει κάποιος), που πιθανώς να διαδραματίζουν τα οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα σιδήρου στους σηματοδοτικούς μηχανισμούς που εμπλέκεται το H_2O_2 .

Στην παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια να διερευνηθεί αν τα ιόντα σιδήρου εμπλέκονται στη μεταγωγή του σήματος στην απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 και να διαλευκανθεί σε ποιο σημείο της αποπτωτικής διαδικασίας αλλά και με ποιον τρόπο τα ιόντα σιδήρου μπορούν να επηρεάσουν αυτή τη διεργασία. Για τη δέσμευση του σιδήρου έγινε χρήση μια ευρέως χρησιμοποιούμενης στην κλινική πράξη σιδηροδεσμευτικής ένωσης, της δεσφεριοξαμίνης, η οποία δε μπορεί να

διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες αλλά προσλαμβάνεται από τα κύτταρα με ενδοκύττωση και μέσω των ενδοσωματίων καταλήγει στα λυσοσωμάτια και πιθανά και σε άλλα ενδοκυττάρια διαμερίσματα.

Στα πρώτα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, παρατηρήθηκε ότι η απομάκρυνση του σιδήρου μέσω προ-επώασης των κυττάρων με δεσφεριοξαμίνη ανέστειλε σε σημαντικό βαθμό τη δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων στο DNA των κυττάρων αλλά και την εξωτερίκευση της φωσφατιδιλοσερινης στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης υποδηλώνοντας τη σπουδαιότητα των ιόντων σιδήρου στον καταρράκτη της αποπτωτικής διαδικασία. Προσπαθώντας να αποσαφηνιστεί σε πιο ακριβώς σημείο εμπλέκονται τα ιόντα σιδήρου, ελέγχθηκαν ένα προς ένα όλα τα γνωστά βήματα της αποπτωτικής διαδικασίας. Διαπιστώθηκε ότι η δέσμευση του σιδήρου ανέστειλε την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, τη μετατόπιση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια, και την ενεργοποίηση της MAP κινάσης JNK, γεγονόςτα κεντρικής σημασίας στη διαδικασία του αποπτωτικού θανάτου.

Η παρατήρηση ότι απουσία ιόντων σιδήρου αναστάλθηκε τόσο η επαγόμενη από το H₂O₂ οξειδωση και απομάκρυνση της Trx-1 από το σύμπλοκο της ASK1 (ανοδική κινάση της JNK) όσο και η οξειδωση της DUSP1 (μια από τις σημαντικότερες τυροσινικές φωσφατάσες της JNK), οι οποίες στο ενεργό τους κέντρο περιέχουν επιρρεπείς σε οξειδωτικές τροποποιήσεις σουλφιδριλικές ομάδες, υποδηλώνει ότι το H₂O₂ χρειάζεται σίδηρο για να προκαλέσει αυτές τις οξειδώσεις. Φαίνεται επομένως, ότι η καταλυόμενη από ιόντα σιδήρου οξειδωση ευαίσθητων σουλφιδριλικών ομάδων πρωτεϊνών αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό μέσω του οποίου το H₂O₂ δρα ως μεταγωγέας σημάτων στην διαδικασία της απόπτωσης. Αν και είναι απαραίτητη η εμβάθυνση και η περαιτέρω διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού μέσω του οποίου τα ιόντα σιδήρου επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση καθώς και τη δραστηριότητα κεντρικών σηματοδοτικών μορίων, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποδεικνύουν ότι η ενδοκυττάρια διαθεσιμότητα των ιόντων σιδήρου αποτελεί αποφασιστικό παράγοντα για τη δράση του H₂O₂ ως δεύτερου διαμεσολαβητή στη μεταγωγή του σήματος στην απόπτωση.

6. SUMMARY

The role of iron on the molecular mechanisms of H₂O₂-induced apoptosis

The ability of iron to exist in various oxidation states (the +2 and +3 valence states are the most important ones) makes it an essential element in many cellular processes associated with basic physiological cell functions. On the other hand, the same high redox potential that enables iron to readily switch between the ferrous and ferric states also makes it potentially toxic. Thus, it is not surprising that nature handles iron with the utmost care and iron homeostasis is carefully regulated by sophisticated mechanisms in order to avoid such injurious interactions. Although iron is usually bound with high affinity to specialized proteins to abrogate the deleterious effects of free iron during oxidative stress, a distinct minor fraction of total cellular iron is thought to be loosely bound to diverse intracellular ligands and serves as a crossroad of cell iron metabolism. This fraction of iron is called redox-active iron and in the presence of H₂O₂, it catalyzes the generation of the extremely reactive hydroxyl radical (HO[•]) via the Fenton Reaction.

Apart from hydrogen peroxide's cytotoxic effects, in recent years it has become established that the intracellular redox status play critical roles for the determination of cell "fate" by eliciting a wide variety of cellular responses, such as proliferation, differentiation and apoptosis. Many intracellular signalling pathways involved in ROS induced cellular responses are regulated by the intracellular redox state, which depends on the balance between the levels of oxidizing and reducing equivalents. Although, the role of H₂O₂ as a messenger in cell signalling is strongly supported by extensive experimental evidence, little information is available regarding the role of iron in such processes.

In the present study, we made an effort to investigate if redox-active iron ions play any role in the molecular mechanism of apoptosis-induced by H₂O₂ and to elucidate the exact chemical reactions that take place in this process. Among several iron chelators, we selected desferrioxamine (DFO), a membrane-impermeant, strong and rather specific iron chelator, which is taken up by fluid phase endocytosis, thus passing late endosomes before reaching lysosomes and other intracellular compartments.

Pre-incubation of cells with DFO resulted in the partial and almost full reduction of the characteristic ladder pattern of oligonucleosomal DNA fragments, as well as in the inhibition of the externalization of phosphatidylserine in the outer leaflet of the plasma membrane, indicating the importance of iron ions in the signaling of apoptosis-induced by H₂O₂. The pathway of the apoptotic procedure was examined step by step, in an effort to indicate the exact point of iron involvement. It was revealed that iron chelation blocked the activation of caspase cascade, the release of cyt-C to the cytosol, the translocation of Bax from cytosol to mitochondria and the phosphorylation of JNK.

The observation that iron chelation inhibited the oxidation and sequestration of Trx-1 from the complex of ASK1 (which is the major upstream kinase of JNK activation in the signaling of apoptosis), as well as the oxidation of DUSP1 (which is one of the most well-known tyrosine phosphatases of JNK), revealed that H₂O₂ requires iron in order to induce such oxidations. Thereafter, the data presented here indicate that iron-mediated oxidations of specific cysteine residues may represent a common mechanism through which H₂O₂ exerts its second-messenger role in the signal transduction pathway of apoptosis. Whether this is an isolated observation or it represents a generalized phenomenon dictating H₂O₂-induced oxidations of sulfhydryl groups remains to be explored.

- Abid, M.R., Tsai, J.C., Spokes, K.C., Deshpande, S.S., Irani, K. and Aird, W.C. (2001) Vascular endothelial growth factor induces manganese-superoxide dismutase expression in endothelial cells by a Rac1-regulated NADPH oxidase-dependent mechanism. *Faseb J*, **15**, 2548-2550.
- Adrain, C. and Martin, S.J. (2001) The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*, **26**, 390-397.
- Akhand, A.A., Pu, M., Senga, T., Kato, M., Suzuki, H., Miyata, T., Hamaguchi, M. and Nakashima, I. (1999) Nitric oxide controls src kinase activity through a sulfhydryl group modification-mediated Tyr-527-independent and Tyr-416-linked mechanism. *J Biol Chem*, **274**, 25821-25826.
- Allerson, C.R., Martinez, A., Yikilmaz, E. and Rouault, T.A. (2003) A high-capacity RNA affinity column for the purification of human IRP1 and IRP2 overexpressed in *Pichia pastoris*. *Rna*, **9**, 364-374.
- Anderson, M.T., Staal, F.J., Gitler, C., Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A. (1994) Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF-kappa B signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11527-11531.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B. and Martinou, J.C. (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem*, **276**, 11615-11623.
- Antunes, F. and Cadenas, E. (2001) Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic Biol Med*, **30**, 1008-1018.
- Aoki, H., Kang, P.M., Hampe, J., Yoshimura, K., Noma, T., Matsuzaki, M. and Izumo, S. (2002) Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem*, **277**, 10244-10250.
- Arai, T., Bhunia, A.K., Chatterjee, S. and Bulkley, G.B. (1998) Lactosylceramide stimulates human neutrophils to upregulate Mac-1, adhere to endothelium, and generate reactive oxygen metabolites in vitro. *Circ Res*, **82**, 540-547.
- Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B. and Rhee, S.G. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, **272**, 217-221.
- Baeuerle, P.A. and Baltimore, D. (1988) Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell*, **53**, 211-217.
- Baeuerle, P.A. and Henkel, T. (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, **12**, 141-179.
- Banfi, B., Clark, R.A., Steger, K. and Krause, K.H. (2003) Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem*, **278**, 3510-3513.
- Barbouti, A., Amorgianiotis, C., Kolettas, E., Kanavaros, P. and Galaris, D. (2007) Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner. *Free Radic Biol Med*, **43**, 1377-1387.
- Barrett, W.C., DeGnore, J.P., Konig, S., Fales, H.M., Keng, Y.F., Zhang, Z.Y., Yim, M.B. and Chock, P.B. (1999) Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215. *Biochemistry*, **38**, 6699-6705.

- Bayraktutan, U., Blayney, L. and Shah, A.M. (2000) Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1903-1911.
- Biteau, B., Labarre, J. and Toledano, M.B. (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*, **425**, 980-984.
- Blanchetot, C., Tertoolen, L.G. and den Hertog, J. (2002) Regulation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha by oxidative stress. *Embo J*, **21**, 493-503.
- Bogoyevitch, M.A. and Kobe, B. (2006) Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, **70**, 1061-1095.
- Bonizzi, G., Piette, J., Schoonbroodt, S., Greimers, R., Havard, L., Merville, M.P. and Bours, V. (1999) Reactive oxygen intermediate-dependent NF-kappaB activation by interleukin-1beta requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity. *Mol Cell Biol*, **19**, 1950-1960.
- Brennan, P. and O'Neill, L.A. (1995) Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor kappa B activation in three different cell lines: evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals. *Biochim Biophys Acta*, **1260**, 167-175.
- Bruyninckx, W.J., Mason, H.S. and Morse, S.A. (1978) Are physiological oxygen concentrations mutagenic? *Nature*, **274**, 606-607.
- Burdon, R.H. and Rice-Evans, C. (1989) Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic Res Commun*, **6**, 345-358.
- Cable, H. and Lloyd, J.B. (1999) Cellular uptake and release of two contrasting iron chelators. *J Pharm Pharmacol*, **51**, 131-134.
- Cairo, G. and Pietrangelo, A. (2000) Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochem J*, **352 Pt 2**, 241-250.
- Cairo, G., Recalcati, S., Pietrangelo, A. and Minotti, G. (2002) The iron regulatory proteins: targets and modulators of free radical reactions and oxidative damage. *Free Radic Biol Med*, **32**, 1237-1243.
- Camps, M., Nichols, A. and Arkininstall, S. (2000) Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb J*, **14**, 6-16.
- Cano, E. and Mahadevan, L.C. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci*, **20**, 117-122.
- Caselli, A., Marzocchini, R., Camici, G., Manao, G., Moneti, G., Pieraccini, G. and Ramponi, G. (1998) The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂. *J Biol Chem*, **273**, 32554-32560.
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, **59**, 527-605.
- Chandra, J., Samali, A. and Orrenius, S. (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **29**, 323-333.
- Chang, L. and Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37-40.
- Chang, T.S., Jeong, W., Woo, H.A., Lee, S.M., Park, S. and Rhee, S.G. (2004) Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *J Biol Chem*, **279**, 50994-51001.
- Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., Podar, K., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Munshi, N., Kharbanda, S. and Anderson, K.C. (2003) JNK-dependent release of

- mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem*, **278**, 17593-17596.
- Chen, L., Xiong, S., She, H., Lin, S.W., Wang, J. and Tsukamoto, H. (2007) Iron causes interactions of TAK1, p21ras, and phosphatidylinositol 3-kinase in caveolae to activate I κ B kinase in hepatic macrophages. *J Biol Chem*, **282**, 5582-5588.
- Chen, Y.R. and Tan, T.H. (2000) The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). *Int J Oncol*, **16**, 651-662.
- Chen, Y.R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R.J. and Tan, T.H. (1996) The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem*, **271**, 31929-31936.
- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T. and Korsmeyer, S.J. (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, **8**, 705-711.
- Chevon, M. (1988) A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radic Biol Med*, **5**, 27-37.
- Chiarugi, P. and Buricchi, F. (2007) Protein tyrosine phosphorylation and reversible oxidation: two cross-talking posttranslation modifications. *Antioxid Redox Signal*, **9**, 1-24.
- Chiarugi, P. and Cirri, P. (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem Sci*, **28**, 509-514.
- Chiarugi, P., Fiaschi, T., Taddei, M.L., Talini, D., Giannoni, E., Raugei, G. and Ramponi, G. (2001) Two vicinal cysteines confer a peculiar redox regulation to low molecular weight protein tyrosine phosphatase in response to platelet-derived growth factor receptor stimulation. *J Biol Chem*, **276**, 33478-33487.
- Cory, S. and Adams, J.M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, **2**, 647-656.
- Cross, J.V. and Templeton, D.J. (2004) Thiol oxidation of cell signaling proteins: Controlling an apoptotic equilibrium. *J Cell Biochem*, **93**, 104-111.
- Das, S.K., White, A.C. and Fanburg, B.L. (1992) Modulation of transforming growth factor-beta 1 antiproliferative effects on endothelial cells by cysteine, cystine, and N-acetylcysteine. *J Clin Invest*, **90**, 1649-1656.
- Davies, K.J. (1999) The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*, **48**, 41-47.
- Davies, K.J. (2000) Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, **50**, 279-289.
- Davis, R.J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, **103**, 239-252.
- De Keulenaer, G.W., Alexander, R.W., Ushio-Fukai, M., Ishizaka, N. and Griendling, K.K. (1998) Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J*, **329 (Pt 3)**, 653-657.
- Deng, X., Xiao, L., Lang, W., Gao, F., Ruvolo, P. and May, W.S., Jr. (2001) Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem*, **276**, 23681-23688.
- Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y. and Wu, X. (2003) A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis. *Cell*, **115**, 61-70.

- Denu, J.M. and Dixon, J.E. (1998) Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Opin Chem Biol*, **2**, 633-641.
- Denu, J.M. and Tanner, K.G. (1998) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry*, **37**, 5633-5642.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. and Martinou, J.C. (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*, **144**, 891-901.
- Dhanasekaran, D.N., Kashef, K., Lee, C.M., Xu, H. and Reddy, E.P. (2007) Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene*, **26**, 3185-3202.
- Dhanasekaran, D.N. and Reddy, E.P. (2008) JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, **27**, 6245-6251.
- Dickinson, R.J. and Keyse, S.M. (2006) Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J Cell Sci*, **119**, 4607-4615.
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S.J., Moynihan, J., Paw, B.H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T.C., Brugnara, C., Lux, S.E., Pinkus, G.S., Pinkus, J.L., Kingsley, P.D., Palis, J., Fleming, M.D., Andrews, N.C. and Zon, L.I. (2000) Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, **403**, 776-781.
- Donovan, N., Becker, E.B., Konishi, Y. and Bonni, A. (2002) JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem*, **277**, 40944-40949.
- Doulias, P.T., Christoforidis, S., Brunk, U.T. and Galaris, D. (2003) Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. *Free Radic Biol Med*, **35**, 719-728.
- Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, **82**, 47-95.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**, 43-50.
- Epsztejn, S., Kakhlon, O., Glickstein, H., Breuer, W. and Cabantchik, I. (1997) Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal Biochem*, **248**, 31-40.
- Er, E., Oliver, L., Cartron, P.F., Juin, P., Manon, S. and Vallette, F.M. (2006) Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta*, **1757**, 1301-1311.
- Esposito, F., Chirico, G., Montesano Gesualdi, N., Posadas, I., Ammendola, R., Russo, T., Cirino, G. and Cimino, F. (2003) Protein kinase B activation by reactive oxygen species is independent of tyrosine kinase receptor phosphorylation and requires SRC activity. *J Biol Chem*, **278**, 20828-20834.
- Farooq, A. and Zhou, M.M. (2004) Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal*, **16**, 769-779.
- Finkel, T. (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 247-254.
- Flohe, L., Brigelius-Flohe, R., Saliou, C., Traber, M.G. and Packer, L. (1997) Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med*, **22**, 1115-1126.

- Franklin, C.C. and Kraft, A.S. (1997) Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J Biol Chem*, **272**, 16917-16923.
- Franklin, C.C., Srikanth, S. and Kraft, A.S. (1998) Conditional expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1, is cytoprotective against UV-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3014-3019.
- Fujino, G., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Yamauchi, S., Saitoh, M., Takeda, K. and Ichijo, H. (2007) Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol Cell Biol*, **27**, 8152-8163.
- Fujino, G., Noguchi, T., Takeda, K. and Ichijo, H. (2006) Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin Cancer Biol*, **16**, 427-435.
- Fukui, T., Ishizaka, N., Rajagopalan, S., Laursen, J.B., Capers, Q.t., Taylor, W.R., Harrison, D.G., de Leon, H., Wilcox, J.N. and Griendling, K.K. (1997) p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res*, **80**, 45-51.
- Galaris, D. and Pantopoulos, K. (2008) Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **45**, 1-23.
- Geiszt, M., Lekstrom, K., Witta, J. and Leto, T.L. (2003) Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem*, **278**, 20006-20012.
- Gotoh, Y. and Cooper, J.A. (1998) Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J Biol Chem*, **273**, 17477-17482.
- Griendling, K.K., Minieri, C.A., Ollerenshaw, J.D. and Alexander, R.W. (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **74**, 1141-1148.
- Gutteridge, J.M. and Halliwell, B. (1982) The role of the superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of DNA and deoxyribose induced by a copper-phenanthroline complex. *Biochem Pharmacol*, **31**, 2801-2805.
- Guyton, K.Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q. and Holbrook, N.J. (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem*, **271**, 4138-4142.
- Halliwell, B. and Aruoma, O.I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, **281**, 9-19.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, **186**, 1-85.
- Hass, U. (2003) Current status of developmental neurotoxicity: regulatory view. *Toxicol Lett*, **140-141**, 155-159.
- Hatai, T., Matsuzawa, A., Inoshita, S., Mochida, Y., Kuroda, T., Sakamaki, K., Kuida, K., Yonehara, S., Ichijo, H. and Takeda, K. (2000) Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *J Biol Chem*, **275**, 26576-26581.
- Henle, E.S., Han, Z., Tang, N., Rai, P., Luo, Y. and Linn, S. (1999) Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated fenton reactions has possible biological implications. *J Biol Chem*, **274**, 962-971.

- Hentze, M.W. and Kuhn, L.C. (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8175-8182.
- Hider, R.C. (2002a) Design of therapeutic chelating agents. *Biochem Soc Trans*, **30**, 751-754.
- Hider, R.C. (2002b) Nature of nontransferrin-bound iron. *Eur J Clin Invest*, **32 Suppl 1**, 50-54.
- Holmgren, A. (1995) Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure*, **3**, 239-243.
- Hsu, Y.T. and Youle, R.J. (1998) Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem*, **273**, 10777-10783.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K. and Gotoh, Y. (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, **275**, 90-94.
- Iordanov, M.S. and Magun, B.E. (1999) Different mechanisms of c-Jun NH(2)-terminal kinase-1 (JNK1) activation by ultraviolet-B radiation and by oxidative stressors. *J Biol Chem*, **274**, 25801-25806.
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T. and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*, **275**, 1649-1652.
- Iwai, K., Klausner, R.D. and Rouault, T.A. (1995) Requirements for iron-regulated degradation of the RNA binding protein, iron regulatory protein 2. *Embo J*, **14**, 5350-5357.
- Jacobson, M.D., Weil, M. and Raff, M.C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell*, **88**, 347-354.
- Janssen-Heininger, Y.M., Poynter, M.E. and Baeuerle, P.A. (2000) Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med*, **28**, 1317-1327.
- Jaspers, I., Zhang, W., Fraser, A., Samet, J.M. and Reed, W. (2001) Hydrogen peroxide has opposing effects on IKK activity and IkappaBalpha breakdown in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **24**, 769-777.
- Jiang, X. and Wang, X. (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem*, **275**, 31199-31203.
- Johnson, G.L. and Nakamura, K. (2007) The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta*, **1773**, 1341-1348.
- Kakhlon, O. and Cabantchik, Z.I. (2002) The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med*, **33**, 1037-1046.
- Kalinowski, D.S. and Richardson, D.R. (2005) The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev*, **57**, 547-583.
- Kallis, G.B. and Holmgren, A. (1980) Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **255**, 10261-10265.
- Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H. and Karin, M. (2005) Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*, **120**, 649-661.

- Kamata, H., Manabe, T., Oka, S., Kamata, K. and Hirata, H. (2002) Hydrogen peroxide activates IkappaB kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. *FEBS Lett*, **519**, 231-237.
- Kanamoto, T., Mota, M., Takeda, K., Rubin, L.L., Miyazono, K., Ichijo, H. and Bazenet, C.E. (2000) Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons. *Mol Cell Biol*, **20**, 196-204.
- Kapahi, P., Takahashi, T., Natoli, G., Adams, S.R., Chen, Y., Tsien, R.Y. and Karin, M. (2000) Inhibition of NF-kappa B activation by arsenite through reaction with a critical cysteine in the activation loop of Ikappa B kinase. *J Biol Chem*, **275**, 36062-36066.
- Kartikasari, A.E., Georgiou, N.A., Visseren, F.L., van Kats-Renaud, H., van Asbeck, B.S. and Marx, J.J. (2004) Intracellular labile iron modulates adhesion of human monocytes to human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 2257-2262.
- Kato, M., Iwashita, T., Takeda, K., Akhand, A.A., Liu, W., Yoshihara, M., Asai, N., Suzuki, H., Takahashi, M. and Nakashima, I. (2000) Ultraviolet light induces redox reaction-mediated dimerization and superactivation of oncogenic Ret tyrosine kinases. *Mol Biol Cell*, **11**, 93-101.
- Keyse, S.M. and Emslie, E.A. (1992) Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature*, **359**, 644-647.
- Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., Pandey, P., Kaneki, M., Wang, Q., Cheng, K., Chen, Y.N., Campbell, A., Sudha, T., Yuan, Z.M., Narula, J., Weichselbaum, R., Nalin, C. and Kufe, D. (2000) Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem*, **275**, 322-327.
- Kim, B.J., Ryu, S.W. and Song, B.J. (2006) JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem*, **281**, 21256-21265.
- Korn, S.H., Wouters, E.F., Vos, N. and Janssen-Heininger, Y.M. (2001) Cytokine-induced activation of nuclear factor-kappa B is inhibited by hydrogen peroxide through oxidative inactivation of IkappaB kinase. *J Biol Chem*, **276**, 35693-35700.
- Kruszewski, M. (2003) Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res*, **531**, 81-92.
- Lee, D.H., Folsom, A.R. and Jacobs, D.R., Jr. (2004a) Dietary iron intake and Type 2 diabetes incidence in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Diabetologia*, **47**, 185-194.
- Lee, F.S., Peters, R.T., Dang, L.C. and Maniatis, T. (1998a) MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and IkappaB kinase beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9319-9324.
- Lee, J.W., Kim, J.E., Park, E.J., Kim, J.H., Lee, C.H., Lee, S.R. and Kwon, J. (2004b) Two conserved cysteine residues are critical for the enzymic function of the human platelet-derived growth factor receptor-beta: evidence for different roles of Cys-822 and Cys-940 in the kinase activity. *Biochem J*, **382**, 631-639.
- Lee, S.R., Kwon, K.S., Kim, S.R. and Rhee, S.G. (1998b) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem*, **273**, 15366-15372.

- Lee, S.R., Yang, K.S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W. and Rhee, S.G. (2002) Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem*, **277**, 20336-20342.
- Lei, K. and Davis, R.J. (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2432-2437.
- Lenaz, G. (2001) The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life*, **52**, 159-164.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.
- Li, L. and Frei, B. (2006) Iron chelation inhibits NF-kappaB-mediated adhesion molecule expression by inhibiting p22(phox) protein expression and NADPH oxidase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 2638-2643.
- Liang, H. and Fesik, S.W. (1997) Three-dimensional structures of proteins involved in programmed cell death. *J Mol Biol*, **274**, 291-302.
- Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H. and Kyriakis, J.M. (2000) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol Cell Biol*, **20**, 2198-2208.
- Liu, Y.X., Wang, J., Guo, J., Wu, J., Lieberman, H.B. and Yin, Y. (2008) DUSP1 is controlled by p53 during the cellular response to oxidative stress. *Mol Cancer Res*, **6**, 624-633.
- Lloyd, J.B., Cable, H. and Rice-Evans, C. (1991) Evidence that desferrioxamine cannot enter cells by passive diffusion. *Biochem Pharmacol*, **41**, 1361-1363.
- Lohse, D.L., Denu, J.M., Santoro, N. and Dixon, J.E. (1997) Roles of aspartic acid-181 and serine-222 in intermediate formation and hydrolysis of the mammalian protein-tyrosine-phosphatase PTP1. *Biochemistry*, **36**, 4568-4575.
- Lu, J. and Holmgren, A. (2009) Selenoproteins. *J Biol Chem*, **284**, 723-727.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481-490.
- Madesh, M., Antonsson, B., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S. and Hajnoczky, G. (2002) Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *J Biol Chem*, **277**, 5651-5659.
- Malhotra, J.D. and Kaufman, R.J. (2007) Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal*, **9**, 2277-2293.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M. and Green, D.R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, **182**, 1545-1556.
- Martindale, J.L. and Holbrook, N.J. (2002) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*, **192**, 1-15.
- Marumo, T., Schini-Kerth, V.B., Fisslthaler, B. and Busse, R. (1997) Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation*, **96**, 2361-2367.

- Matsuzawa, A. and Ichijo, H. (2001) Molecular mechanisms of the decision between life and death: regulation of apoptosis by apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biochem*, **130**, 1-8.
- Matsuzawa, A. and Ichijo, H. (2005) Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal*, **7**, 472-481.
- Matsuzawa, A. and Ichijo, H. (2008) Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta*, **1780**, 1325-1336.
- Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Takeda, K. and Ichijo, H. (2002) Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice. *Antioxid Redox Signal*, **4**, 415-425.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem*, **244**, 6049-6055.
- McDonnell, J.M., Fushman, D., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. and Cowburn, D. (1999) Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell*, **96**, 625-634.
- Meier, B., Cross, A.R., Hancock, J.T., Kaup, F.J. and Jones, O.T. (1991) Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J*, **275** (Pt 1), 241-245.
- Meier, P., Finch, A. and Evan, G. (2000) Apoptosis in development. *Nature*, **407**, 796-801.
- Meneghini, R. (1997) Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med*, **23**, 783-792.
- Meng, T.C., Fukada, T. and Tonks, N.K. (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell*, **9**, 387-399.
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Pulkrabek, D.J., Dong, Z., Venkatachalam, M.A. and Saikumar, P. (2001) Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, **276**, 18361-18374.
- Morita, K., Saitoh, M., Tobiume, K., Matsuura, H., Enomoto, S., Nishitoh, H. and Ichijo, H. (2001) Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *Embo J*, **20**, 6028-6036.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L. and Fesik, S.W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, **381**, 335-341.
- Murata, H., Ihara, Y., Nakamura, H., Yodoi, J., Sumikawa, K. and Kondo, T. (2003) Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *J Biol Chem*, **278**, 50226-50233.
- Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K. and Ichijo, H. (2007) Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol*, **40**, 1-6.
- Nemoto, S., DiDonato, J.A. and Lin, A. (1998) Coordinate regulation of I κ B kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF- κ B-inducing kinase. *Mol Cell Biol*, **18**, 7336-7343.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. and et al. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, **376**, 37-43.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A. and Ichijo, H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic

- reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*, **16**, 1345-1355.
- Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K. and Ichijo, H. (1998) ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell*, **2**, 389-395.
- Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., Inoue, J. and Ichijo, H. (2005) Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J Biol Chem*, **280**, 37033-37040.
- Pantano, C., Reynaert, N.L., van der Vliet, A. and Janssen-Heininger, Y.M. (2006) Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxid Redox Signal*, **8**, 1791-1806.
- Papa, S., Bubici, C., Pham, C.G., Zazzeroni, F. and Franzoso, G. (2005) NF-kappaB meets ROS: an 'iron-ic' encounter. *Cell Death Differ*, **12**, 1259-1262.
- Papanikolaou, G. and Pantopoulos, K. (2005) Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, **202**, 199-211.
- Park, H.S., Jung, H.Y., Park, E.Y., Kim, J., Lee, W.J. and Bae, Y.S. (2004) Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol*, **173**, 3589-3593.
- Patterson, K.I., Brummer, T., O'Brien, P.M. and Daly, R.J. (2009) Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J*, **418**, 475-489.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M.H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, **22**, 153-183.
- Peskin, A.V., Zbarsky, I.B. and Konstantinov, A.A. (1980) A novel type of superoxide generating system in nuclear membranes from hepatoma 22a ascites cells. *FEBS Lett*, **117**, 44-48.
- Petrat, F., de Groot, H., Sustmann, R. and Rauen, U. (2002) The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol Chem*, **383**, 489-502.
- Petrat, F., Rauen, U. and de Groot, H. (1999) Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, phen green SK. *Hepatology*, **29**, 1171-1179.
- Petros, A.M., Medek, A., Nettesheim, D.G., Kim, D.H., Yoon, H.S., Swift, K., Matayoshi, E.D., Oltersdorf, T. and Fesik, S.W. (2001) Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3012-3017.
- Pham, C.G., Bubici, C., Zazzeroni, F., Papa, S., Jones, J., Alvarez, K., Jayawardena, S., De Smaele, E., Cong, R., Beaumont, C., Torti, F.M., Torti, S.V. and Franzoso, G. (2004) Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell*, **119**, 529-542.
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E. and Woodgett, J.R. (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*, **353**, 670-674.
- Putcha, G.V., Le, S., Frank, S., Besirli, C.G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R.J., LaMarche, A., Maroney, A.C. and Johnson, E.M., Jr. (2003) JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron*, **38**, 899-914.

- Reynaert, N.L., Ckless, K., Korn, S.H., Vos, N., Guala, A.S., Wouters, E.F., van der Vliet, A. and Janssen-Heininger, Y.M. (2004) Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8945-8950.
- Rhee, S.G. (1999) Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med*, **31**, 53-59.
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Chang, T.S., Jeong, W. and Kim, K. (2001) Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life*, **52**, 35-41.
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Jeong, W., Chang, T.S., Yang, K.S. and Woo, H.A. (2005) Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 183-189.
- Richardson, D.R. (2004) Novel chelators for central nervous system disorders that involve alterations in the metabolism of iron and other metal ions. *Ann N Y Acad Sci*, **1012**, 326-341.
- Ritz, D. and Beckwith, J. (2002) Redox state of cytoplasmic thioredoxin. *Methods Enzymol*, **347**, 360-370.
- Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M. and Santoro, M.G. (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature*, **403**, 103-108.
- Roussel, R.R. and Barchowsky, A. (2000) Arsenic inhibits NF-kappaB-mediated gene transcription by blocking IkappaB kinase activity and IkappaBalpha phosphorylation and degradation. *Arch Biochem Biophys*, **377**, 204-212.
- Ryan, K.A., Smith, M.F., Jr., Sanders, M.K. and Ernst, P.B. (2004) Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect Immun*, **72**, 2123-2130.
- Saeki, K., Kobayashi, N., Inazawa, Y., Zhang, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., Saeki, K., Isemura, M. and Yuo, A. (2002) Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis. *Biochem J*, **368**, 705-720.
- Saito, J., Toriumi, S., Awano, K., Ichijo, H., Sasaki, K., Kobayashi, T. and Tamura, S. (2007) Regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by protein phosphatase 2Cepsilon. *Biochem J*, **405**, 591-596.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K. and Ichijo, H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J*, **17**, 2596-2606.
- Sakon, S., Xue, X., Takekawa, M., Sasazuki, T., Okazaki, T., Kojima, Y., Piao, J.H., Yagita, H., Okumura, K., Doi, T. and Nakano, H. (2003) NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *Embo J*, **22**, 3898-3909.
- Sanlioglu, S., Williams, C.M., Samavati, L., Butler, N.S., Wang, G., McCray, P.B., Jr., Ritchie, T.C., Hunninghake, G.W., Zandi, E. and Engelhardt, J.F. (2001) Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor-alpha secretion through IKK regulation of NF-kappa B. *J Biol Chem*, **276**, 30188-30198.

- Sappey, C., Legrand-Poels, S., Best-Belpomme, M., Favier, A., Rentier, B. and Piette, J. (1994) Stimulation of glutathione peroxidase activity decreases HIV type 1 activation after oxidative stress. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **10**, 1451-1461.
- Satriano, J.A., Shuldiner, M., Hora, K., Xing, Y., Shan, Z. and Schlondorff, D. (1993) Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J Clin Invest*, **92**, 1564-1571.
- Savitsky, P.A. and Finkel, T. (2002) Redox regulation of Cdc25C. *J Biol Chem*, **277**, 20535-20540.
- Scheid, M.P. and Woodgett, J.R. (2001) PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 760-768.
- Schenk, H., Klein, M., Erdbrugger, W., Droge, W. and Schulze-Osthoff, K. (1994) Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1672-1676.
- Schmid, E., El Benna, J., Galter, D., Klein, G. and Droge, W. (1998) Redox priming of the insulin receptor beta-chain associated with altered tyrosine kinase activity and insulin responsiveness in the absence of tyrosine autophosphorylation. *Faseb J*, **12**, 863-870.
- Schmid, E., Hotz-Wagenblatt, A., Hacj, V. and Droge, W. (1999) Phosphorylation of the insulin receptor kinase by phosphocreatine in combination with hydrogen peroxide: the structural basis of redox priming. *Faseb J*, **13**, 1491-1500.
- Schmidt, K.N., Amstad, P., Cerutti, P. and Baeuerle, P.A. (1995) The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem Biol*, **2**, 13-22.
- Schreck, R., Rieber, P. and Baeuerle, P.A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J*, **10**, 2247-2258.
- Schroeter, H., Boyd, C.S., Ahmed, R., Spencer, J.P., Duncan, R.F., Rice-Evans, C. and Cadenas, E. (2003) c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis. *Biochem J*, **372**, 359-369.
- Schulze-Osthoff, K., Los, M. and Baeuerle, P.A. (1995) Redox signalling by transcription factors NF-kappa B and AP-1 in lymphocytes. *Biochem Pharmacol*, **50**, 735-741.
- Senga, T., Miyazaki, K., Machida, K., Iwata, H., Matsuda, S., Nakashima, I. and Hamaguchi, M. (2000) Clustered cysteine residues in the kinase domain of v-Src: critical role for protein stability, cell transformation and sensitivity to herbimycin A. *Oncogene*, **19**, 273-279.
- Shaheen, N.J., Silverman, L.M., Keku, T., Lawrence, L.B., Rohlf, E.M., Martin, C.F., Galanko, J. and Sandler, R.S. (2003) Association between hemochromatosis (HFE) gene mutation carrier status and the risk of colon cancer. *J Natl Cancer Inst*, **95**, 154-159.
- Sies, H. and Cadenas, E. (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **311**, 617-631.
- Sluss, H.K., Barrett, T., Derijard, B. and Davis, R.J. (1994) Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol Cell Biol*, **14**, 8376-8384.

- Song, J.J. and Lee, Y.J. (2003) Differential role of glutaredoxin and thioredoxin in metabolic oxidative stress-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Biochem J*, **373**, 845-853.
- Song, J.J., Rhee, J.G., Suntharalingam, M., Walsh, S.A., Spitz, D.R. and Lee, Y.J. (2002) Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H₂O₂. *J Biol Chem*, **277**, 46566-46575.
- Staal, F.J., Roederer, M., Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A. (1990) Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9943-9947.
- Stohs, S.J. and Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*, **18**, 321-336.
- Sulciner, D.J., Irani, K., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Goldschmidt-Clermont, P. and Finkel, T. (1996) rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, **16**, 7115-7121.
- Sullivan, J.L. (2003) Are menstruating women protected from heart disease because of, or in spite of, estrogen? Relevance to the iron hypothesis. *Am Heart J*, **145**, 190-194.
- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K. and Finkel, T. (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, **270**, 296-299.
- Takeda, K., Noguchi, T., Naguro, I. and Ichijo, H. (2008) Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **48**, 199-225.
- Takeya, R., Ueno, N., Kami, K., Taura, M., Kohjima, M., Izaki, T., Nunoi, H. and Sumimoto, H. (2003) Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem*, **278**, 25234-25246.
- Tammariello, S.P., Quinn, M.T. and Estus, S. (2000) NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci*, **20**, RC53.
- Tanoue, T. and Nishida, E. (2003) Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal*, **15**, 455-462.
- Tenopoulou, M., Doulias, P.T., Barbouti, A., Brunk, U. and Galaris, D. (2005) Role of compartmentalized redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem J*, **387**, 703-710.
- Tenopoulou, M., Kurz, T., Doulias, P.T., Galaris, D. and Brunk, U.T. (2007) Does the calcein-AM method assay the total cellular 'labile iron pool' or only a fraction of it? *Biochem J*, **403**, 261-266.
- Thannickal, V.J., Day, R.M., Klinz, S.G., Bastien, M.C., Larios, J.M. and Fanburg, B.L. (2000) Ras-dependent and -independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF-beta1. *Faseb J*, **14**, 1741-1748.
- Theil, E.C. and Eisenstein, R.S. (2000) Combinatorial mRNA regulation: iron regulatory proteins and iso-iron-responsive elements (Iso-IREs). *J Biol Chem*, **275**, 40659-40662.
- Theodosiou, A. and Ashworth, A. (2002) MAP kinase phosphatases. *Genome Biol*, **3**, REVIEWS3009.
- Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T. and Ichijo, H. (2001) ASK1 is required

- for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*, **2**, 222-228.
- Tobiume, K., Saitoh, M. and Ichijo, H. (2002) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J Cell Physiol*, **191**, 95-104.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A. and Davis, R.J. (2000) Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, **288**, 870-874.
- Toyokuni, S. (2002) Iron and carcinogenesis: from Fenton reaction to target genes. *Redox Rep*, **7**, 189-197.
- Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *Embo J*, **23**, 1889-1899.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P. and Ron, D. (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, **287**, 664-666.
- Ushio-Fukai, M., Zafari, A.M., Fukui, T., Ishizaka, N. and Griendling, K.K. (1996) p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **271**, 23317-23321.
- Van Laethem, A., Nys, K., Van Kelst, S., Claerhout, S., Ichijo, H., Vandenheede, J.R., Garmyn, M. and Agostinis, P. (2006) Apoptosis signal regulating kinase-1 connects reactive oxygen species to p38 MAPK-induced mitochondrial apoptosis in UVB-irradiated human keratinocytes. *Free Radic Biol Med*, **41**, 1361-1371.
- Vaux, D.L. and Korsmeyer, S.J. (1999) Cell death in development. *Cell*, **96**, 245-254.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. and Kolesnick, R.N. (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature*, **380**, 75-79.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, **184**, 39-51.
- Wang, J. and Pantopoulos, K. (2002) Conditional derepression of ferritin synthesis in cells expressing a constitutive IRP1 mutant. *Mol Cell Biol*, **22**, 4638-4651.
- Wang, X.S., Diener, K., Jannuzzi, D., Trollinger, D., Tan, T.H., Lichenstein, H., Zukowski, M. and Yao, Z. (1996) Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase kinase. *J Biol Chem*, **271**, 31607-31611.
- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*, **14**, 2060-2071.
- Weichsel, A., Gasdaska, J.R., Powis, G. and Montfort, W.R. (1996) Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure*, **4**, 735-751.
- Wiese, A.G., Pacifici, R.E. and Davies, K.J. (1995) Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys*, **318**, 231-240.

- Willoughby, E.A., Perkins, G.R., Collins, M.K. and Whitmarsh, A.J. (2003) The JNK-interacting protein-1 scaffold protein targets MAPK phosphatase-7 to dephosphorylate JNK. *J Biol Chem*, **278**, 10731-10736.
- Wilson, D.J., Fortner, K.A., Lynch, D.H., Mattingly, R.R., Macara, I.G., Posada, J.A. and Budd, R.C. (1996) JNK, but not MAPK, activation is associated with Fas-mediated apoptosis in human T cells. *Eur J Immunol*, **26**, 989-994.
- Wood, Z.A., Schroder, E., Robin Harris, J. and Poole, L.B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, **28**, 32-40.
- Wu, J.J. and Bennett, A.M. (2005) Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. *J Biol Chem*, **280**, 16461-16466.
- Xiong, S., She, H., Takeuchi, H., Han, B., Engelhardt, J.F., Barton, C.H., Zandi, E., Giulivi, C. and Tsukamoto, H. (2003) Signaling role of intracellular iron in NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, **278**, 17646-17654.
- Yamamoto, K., Ichijo, H. and Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol*, **19**, 8469-8478.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P. and Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, **275**, 1129-1132.
- Yoshioka, J., Schreiter, E.R. and Lee, R.T. (2006) Role of thioredoxin in cell growth through interactions with signaling molecules. *Antioxid Redox Signal*, **8**, 2143-2151.
- Youle, R.J. and Strasser, A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 47-59.
- Zamocky, M., Furtmuller, P.G. and Obinger, C. (2008) Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal*, **10**, 1527-1548.
- Zanke, B.W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L.A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F.F. and Woodgett, J.R. (1996) The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr Biol*, **6**, 606-613.
- Zhang, W.J. and Frei, B. (2003) Intracellular metal ion chelators inhibit TNFalpha-induced SP-1 activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, **34**, 674-682.
- Zhang, Z.Y. and Dixon, J.E. (1993) Active site labeling of the Yersinia protein tyrosine phosphatase: the determination of the pKa of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402. *Biochemistry*, **32**, 9340-9345.
- Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R. and Thompson, C.B. (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*, **15**, 1481-1486.