



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

-

ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΑΣΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ Ι

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗ  
ΡΥΘΜΙΣΗ ΘΕΜΕΛΙΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΩΝ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΗΣ**

**ΕΛΕΝΗ ΧΑΝΤΖΟΥΡΑ**

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011







ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

-

ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ  
ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΑΣΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ Ι

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ  
ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ  
ΘΕΜΕΛΙΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΩΝ  
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ  
ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΗΣ**

**ΕΛΕΝΗ ΧΑΝΤΖΟΥΡΑ**

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011**



Νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος : «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).







**ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α.) υπό την επίβλεψη του Ερευνητή Β΄ Δρ. Ιωάννη Σπύρου. Συγχρηματοδοτήθηκε από το Περιφερειακό Επιχειρησιακό Πρόγραμμα (ΠΕΠ) Αττικής και από πόρους του Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α..



Dr Prinarakis



Dr Bessa

Elena



Dr Spyrou



Panos

Maria



Eleni





## **ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ**

<b>1.</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)</b>	<b>11</b>
1.1.1	Πηγές των ROS	13
1.1.2	Οφέλη των ROS	14
1.1.2.1	HIF-1	16
1.1.3	Οξειδωτικό στρες	19
1.1.4	Αντιοξειδωτικά	21
<b>1.2</b>	<b>Η ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΩΝ</b>	<b>22</b>
1.2.1	Το Σύστημα της Θειορεδοξίνης	25
1.2.1.1	Θειορεδοξίνη (TRX)	25
1.2.1.1.1	Θειορεδοξίνες των Θηλαστικών	27
1.2.1.2	Αναγωγή της Θειορεδοξίνης (TRXR)	32
1.2.1.2.1	Αναγωγάσες των Θειορεδοξινών των Θηλαστικών	33
1.2.2	Το Σύστημα της Γλουταρεδοξίνης	37
1.2.2.1	Γλουταρεδοξίνες των Θηλαστικών	39
1.2.2.1.1	Η Κυτταροπλασματική Γλουταρεδοξίνη των Θηλαστικών (GRX1)	39
1.2.2.2	Γλουταθειόνη: Από το οξειδωτικό στρες στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση	42
<b>1.3</b>	<b>ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΝΟΣΙΑΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ</b>	<b>54</b>
1.3.1	Η Υπεροικογένεια TLR / IL-1R	55
1.3.1.1	Μονοπάτια των TIRs	60
1.3.1.1.1	Το MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι	60
1.3.1.1.2	Το MyD88-ανεξάρτητο μονοπάτι	64
1.3.2	Μονοπάτια αντι-ιικής φυσικής ανοσίας	67
1.3.2.1	Ανίχνευση του ιικού εισβολέα	67
1.3.2.2	Ιντερφερόνη (IFN)	70

1.3.2.2.1	Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της IFNβ κατά την ιική μόλυνση	71
1.4	<b>ΣΚΟΠΟΣ</b>	<b>74</b>
2.	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>77</b>
2.1	<b>ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</b>	<b>79</b>
2.1.1	Ανακαλλιέργεια	79
2.1.2	Ψύξη-Απόψυξη Κυττάρων	81
2.1.3	Επιμόλυνση Κυττάρων	81
2.1.4	Μόλυνση Κυττάρων με Ιό	82
2.1.5	Χορήγηση BSO	82
2.1.6	Χορήγηση IL-1	82
2.1.7	Συγκαλλιέργεια κυττάρων HEK και RAW264.7	82
2.1.8	Σήμανση με το ραδιοϊσότοπο <sup>35</sup> S	83
2.1.9	Μέτρηση ATP	83
2.2	<b>ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ</b>	<b>84</b>
2.2.1	Πλασμιδιακές κατασκευές	84
2.2.2	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	88
2.2.3	Δεκτικά Κύτταρα XL-1 Blue(competent cells)	89
2.3	<b>ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ</b>	<b>89</b>
2.4	<b>RNA ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ (RNAi)</b>	<b>91</b>
2.4.1	Αναδιάταξη siRNA και εισαγωγή του στο φορέα κλωνοποίησης	93
2.4.2	Δημιουργία κυτταρικών σειρών σταθερά επιμολυσμένων με το siRNA της GRX1	93
2.5	<b>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ</b>	<b>94</b>
2.6	<b>PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL-TIME PCR)</b>	<b>95</b>
2.7	<b>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ</b>	<b>98</b>
2.8	<b>ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ</b>	<b>100</b>

2.8.1	Παρασκευή αντισωμάτων συζευγμένων στα σφαιρίδια	101
2.8.2	Ανοσοκατακρήμνιση	103
<b>2.9</b>	<b>ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΜΙΑΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN</b>	<b>104</b>
2.9.1	Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης	105
2.9.2	Μη-αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης (native gel)	107
2.9.3	Ανοσοσύπωση κατά Western	109
<b>2.10</b>	<b>ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ-DNA</b>	<b>111</b>
2.10.1	Ακινητοποίηση των νουκλεϊκών οξέων	112
2.10.2	Προετοιμασία της αντίδρασης πρόσδεσης	112
2.10.3	Πρόσδεση πρωτεΐνης-DNA	113
<b>2.11</b>	<b>ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ</b>	<b>113</b>
2.11.1	Παρασκευή δείγματος	114
2.11.2	Διαδικασία	114
2.11.3	Υπολογισμοί	115
<b>3.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>117</b>
<b>3.1</b>	<b>ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ TRX ΡΥΘΜΙΖΕΙ ΤΗ ΝΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ HIF-1α</b>	<b>119</b>
3.1.1	Οι TRX2/TRXR2 και TRX1, η συσσώρευση της HIF-1α και η ενεργότητα του HIF-1	119
3.1.2	Η TRX1 και η TRX2/TRXR2 ρυθμίζουν διαφορετικά τη μετάφραση της HIF-1α	120
3.1.3	Οι TRX1 και TRX2/TRXR2 επηρεάζουν διαφορετικά τα επίπεδα του ATP	124
<b>3.2</b>	<b>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ GRX1 ΣΕ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΟΣΙΑΣ</b>	<b>126</b>
3.2.1	Κυτταρικές σειρές με μειωμένα επίπεδα GRX1	126
3.2.2	Η GRX1 ρυθμίζει την ενεργοποίηση του TRAF6 και την IL-1/TLR4 σηματοδότηση	128
3.2.2.1	Η GRX1 είναι αναγκαία για την προερχόμενη από τον TRAF6 ενεργοποίηση του NF-κΒ	128

3.2.2.2	Ο TRAF6 γλουταθειονυλιώνεται στην περιοχή του RING δαχτύλου	130
3.2.2.3	Ο TRAF6 απογλουταθειονυλιώνεται μετά την επαγωγή με IL-1	130
3.2.2.4	Η απογλουταθειονυλίωση του TRAF6 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή του	132
3.2.3	Η GRX1 συμμετέχει στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της IFNβ	134
3.2.3.1	Η GRX1 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της -110 γενετικής περιοχής από τον ιό	134
3.2.3.2	Αποκατάσταση της ικκής επαγωγής στα TG14 μέσω υπερέκφρασης της GRX1	137
3.2.3.3	Τα επίπεδα της GRX1 επηρεάζουν την παραγωγή της IFNβ μετά την επαγωγή με ιό	137
3.2.3.4	GRX1-καταλυόμενη απογλουταθειονυλίωση του IRF3 κατά την ικκή προσβολή	139
3.2.3.5	Η GRX1 δε χρειάζεται για το διμερισμό και τη μετάβασή του IRF3 στον πυρήνα	141
3.2.3.6	Η GRX1 είναι απαραίτητη για την ικανότητα του IRF3 να προωθεί τη μεταγραφή	143
3.2.3.7	Η απογλουταθειονυλίωση του IRF3 απαιτείται για την αλληλεπίδραση IRF3-CBP	144
3.2.3.8	Σε ποια κυστεΐνη λαμβάνει χώρα η γλουταθειονυλίωση?	147
<b>4.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>149</b>
4.1	ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΗΣ ΚΑΙ Η ΝΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ HIF-1α	151
4.2	GRX1, ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΑΝΟΣΙΑ	155
4.2.1	Η GRX1 εμπλέκεται στη σηματοδότηση των IL-1R/TLR4	155
4.2.2	Η GRX1 εμπλέκεται στην ικκή επαγωγή του γονιδίου της IFNβ	157
<b>5.</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>163</b>
<b>6.</b>	<b>ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ</b>	<b>167</b>

6.1	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΘΕΜΕΛΙΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ	169
6.2	THE ROLE OF THIOREDOXIN SUPERFAMILY ON THE REGULATION OF FUNDAMENTAL CELLULAR PROCESSES	171
7.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	173
8.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	183





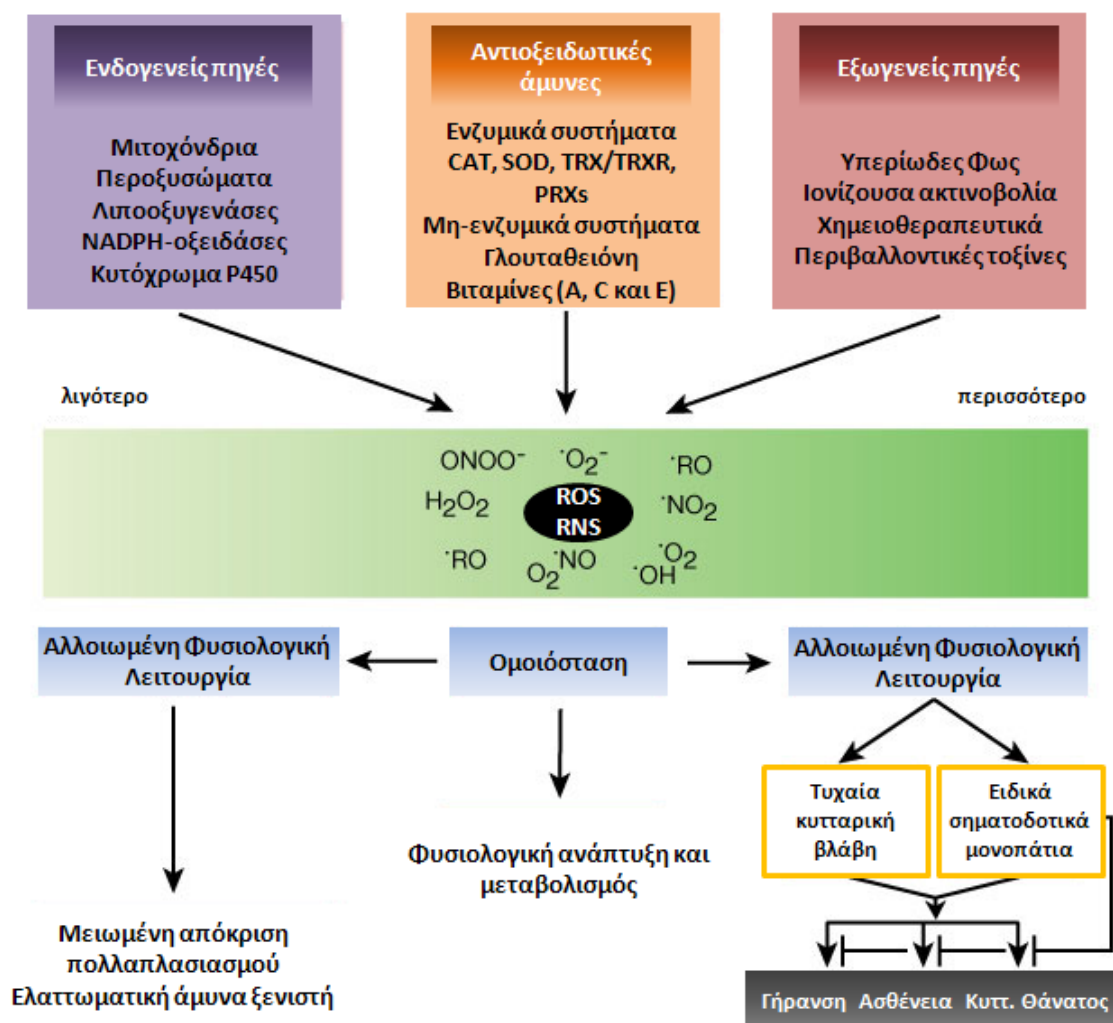
# εισαγωγή



### 1.1 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)

Οι αιτίες των δηλητηριωδών ιδιοτήτων του οξυγόνου ήταν ασαφείς μέχρι και το 1954, οπότε η Rebecca Gershman υποστήριξε ότι η τοξικότητα του οξυγόνου οφείλεται σε εν μέρει ανηγμένες μορφές οξυγόνου (Gerschman R et al., 1954). Την ίδια χρονιά, αναφέρθηκε η παρατήρηση ενός ασθενούς σήματος Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR) που αποδόθηκε στην παρουσία ελεύθερων ριζών σε μία ποικιλία λυοφιλιωμένων βιολογικών υλικών (Commoner B et al., 1954). Ο κόσμος των ελεύθερων ριζών εξερευνήθηκε εν συνεχεία από το Harman που πρότεινε ότι συμμετέχουν στη διαδικασία της γήρανσης (Harman D, 1956). Αυτή η εργασία προσέλυσε σταδιακά έντονο ενδιαφέρον στο πεδίο των ελεύθερων ριζών στα βιολογικά συστήματα. Μία δεύτερη εποχή για την έρευνα των ελεύθερων ριζών ξεκίνησε το 1969, όταν οι McCord και Fridovich ανακάλυψαν το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου (superoxide dismutase, SOD) και παρέιχαν έτσι πειστικά στοιχεία για τη σημασία των ελεύθερων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς (McCord JM and Fridovich I, 1969). Η τρίτη περίοδος των ελεύθερων ριζών στα βιολογικά συστήματα ξεκινάει το 1977 που οι Mittal και Murad έδειξαν ότι η ρίζα του υδροξυλίου,  $\bullet\text{OH}$ , επάγει την ενεργοποίηση της γουανυλικής κυκλάσης και το σχηματισμό της μονοφωσφορικής κυκλικής γουανοσίνης (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) (Mittal CK and Murad F, 1977). Έκτοτε, ένας μεγάλος όγκος δεδομένων έχει συσσωρευτεί και αποδεικνύει ότι οι ζωντανοί οργανισμοί όχι μόνο έχουν προσαρμοστεί στη συνύπαρξη με τις ελεύθερες ρίζες, αλλά έχουν εξελίξει και ποικίλους μηχανισμούς για την πλεονεκτική χρήση τους σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες.

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ή, πιο γενικά, οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), καθώς και οι δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS), αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού (Betteridge DJ, 2000; Fridovich I, 1999; Halliwell B, 1996; Halliwell B, 1999). Κάποιες από αυτές τις μορφές είναι ιδιαίτερα δραστικές, όπως η ρίζα υδροξυλίου, ενώ κάποιες άλλες λιγότερο (το ανιόν του υπεροξειδίου,  $\bullet\text{O}_2^-$  και το υπεροξείδιο του υδρογόνου,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Στην **Εικόνα 1** συνοψίζονται τα κύρια στοιχεία της βιολογίας των ROS, στα οποία γίνεται αναλυτικότερη αναφορά στη συνέχεια της παρούσας εργασίας.



**Εικόνα 1. Τα κύρια στοιχεία της βιολογίας των ROS.**

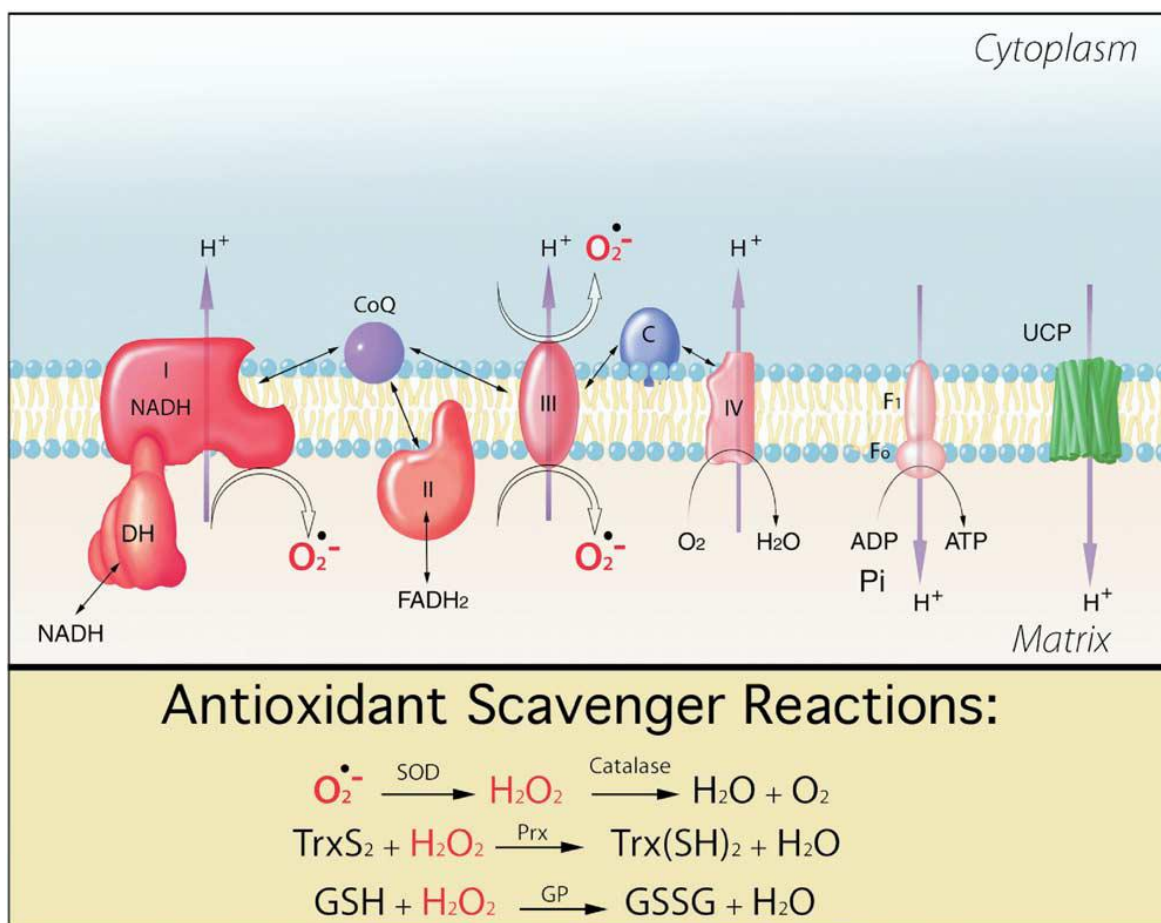
Οι οξειδωτικοί παράγοντες δημιουργούνται ως αποτέλεσμα του φυσιολογικού ενδοκυτταρίου μεταβολισμού στα μιτοχόνδρια και τα περοξυσώματα, καθώς και από μία πληθώρα κυτταροπλασματικών ενζυμικών συστημάτων. Επιπρόσθετα, ένας αριθμός εξωτερικών παραγόντων μπορεί να εκκινήσει την παραγωγή ROS. Ένα πολύπλοκο ενζυμικό και μη-ενζυμικό σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας που περιλαμβάνει την καταλάση (CAT), τη δισμουτάση του σουπεροξειδικού ανιόντος (SOD), το σύστημα θειορεδοξίνης (TRX/TRXR) και τις περοξυρεδοξίνες (PRXs) αντιτίθεται και ρυθμίζει τα συνολικά επίπεδα των ROS προκειμένου να διατηρήσει τη φυσιολογική ομοιόσταση. Η μείωση των επιπέδων των ROS κάτω από το καθορισμένο σημείο ομοιόστασης ενδεχομένως να επηρεάσει το φυσιολογικό ρόλο των οξειδωτικών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην άμυνα του ξενιστή. Παρόμοια, η αυξημένη συγκέντρωση των ROS μπορεί να αποδειχθεί εξίσου βλαβερή και να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο ή στην επιτάχυνση της γήρανσης και των συνδεόμενων με αυτή ασθενειών. Παραδοσιακά, η βλάβη που προκαλείται από την περίσσεια των ROS θεωρείται ότι προέρχεται από την τυχαία βλάβη στις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA. Εκτός από αυτές τις δράσεις, μία αύξηση των επιπέδων των ROS μπορεί να αποτελεί και ένα σήμα στρες το οποίο να ενεργοποιεί ειδικά οξειδοαναγωγικά-ευαίσθητα μονοπάτια. Αφού ενεργοποιηθούν, αυτά τα διαφορετικά μονοπάτια μπορεί να έχουν είτε βλαβερές ή εν δυνάμει προστατευτικές λειτουργίες (Finkel T and Holbrook NJ, 2000).

### 1.1.1 Πηγές των ROS

**Ενδογενείς πηγές ROS:** Πολλές από τις αντιδράσεις δημιουργίας ROS είναι αυθόρμητες, π.χ. ο σχηματισμός σουπεροξειδικού ανιόντος σε ένα πλούσιο σε ηλεκτρόνια περιβάλλον. Άλλες αντιδράσεις δημιουργίας ROS περιλαμβάνουν την παραγωγή από φλαβοένζυμα, π.χ. από την οξειδάση της ξανθίνης και τις NADPH-οξειδάσες (Kamata H and Hirata H, 1999; Kurpusamy P and Zweier JL, 1989; Riley PA, 1994). Το ενδοπλασματικό δίκτυο εμπλέκεται όχι μόνο στην πρωτεϊνική και λιπιδική σύνθεση, αλλά και στην αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών. Η παραπάνω διαδικασία, όπως και η οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων στο οργανίδιο αυτό, μπορεί να παράγει λιπιδικά περοξειδία,  $H_2O_2$  και/ ή σουπεροξειδικό ανιόν (Aust SD et al., 1972; Cardevila J et al., 1981; Freeman BA and Crapo JD, 1982). Μία άλλη σημαντική πηγή ROS είναι τα περοξυσώματα (Boveris A et al., 1972). Κάποια ένζυμα, ειδικά των περοξυσωμάτων, παράγουν  $H_2O_2$ , το οποίο εμπλέκεται στην οξείδωση και αποτοξίνωση υποστρωμάτων, μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από την ειδική καταλάση των περοξυσωμάτων (Tolbert NE and Essner E, 1981). Επίσης, η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, εκτός από τα μιτοχόνδρια, λαμβάνει χώρα και στα περοξυσώματα (Purdue PE and Lazarow PB, 2001). Ωστόσο, ένα πολύ μικρό τμήμα του  $H_2O_2$  που παράγεται στο περοξύσωμα διαφεύγει της καταλάσης και του οργανιδίου (Boveris A et al., 1972; Poole B, 1975). Οι ROS μπορούν να παραχθούν και από μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης, όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια (Martindale JL and Holbrook NJ, 2002).

Εάν και όλες οι παραπάνω πηγές συνεισφέρουν στο συνολικό οξειδωτικό φορτίο, η μεγάλη πλειονότητα των ενδοκυττάρων ROS (γύρω στο 90%) προέρχεται από τα μιτοχόνδρια και συγκεκριμένα από την αναπνευστική αλυσίδα (**Εικόνα 2**). Εδώ, ο συνδυασμός ενός πλούσιου σε ηλεκτρόνια περιβάλλοντος και της συσσωμάτωσης πρωτεϊνών με μέταλλα μετάπτωσης καθιστά ένα εξάισιο υπόβαθρο για το σχηματισμό ριζών (Freeman BA and Crapo JD, 1982; Halliwell B, 1987; Halliwell B and Gutteridge JM, 1985). Στο παρελθόν, η παραγωγή των ROS αντιμετωπιζόταν ως μία μη-παραγωγική πλευρική αντίδραση. Πλέον, έχει προταθεί, ότι είναι σημαντική σε πολλά οξειδοαναγωγικά-εξαρτώμενα σηματοδοτικά μονοπάτια, καθώς και στη διαδικασία της γήρανσης (Balaban RS et al., 2005).

**Εξωγενείς πηγές ROS:** Στις εξωγενείς πηγές ROS ανήκουν το μολυσμένο νερό και ο αέρας, το κάπνισμα, το αλκοόλ, τα βαριά μέταλλα ή μέταλλα μετάπτωσης, συγκεκριμένα φάρμακα (π.χ. κυκλοσπορίνη, γενταμικίνη), το μαγείρεμα (π.χ. καπνιστο κρέας, χρησιμοποιημένο λάδι, λίπος) και η ακτινοβολία. Μετά την είσοδο στο σώμα από διάφορες διαδρομές, τα παραπάνω συστατικά αποσυντίθενται ή μεταβολίζονται σε ROS (Pham-Huy LA et al., 2008).



**Εικόνα 2. Σχηματικό μοντέλο της παραγωγής των ROS στα μιτοχόνδρια.**

Σημειώνονται οι κύριες θέσεις δημιουργίας σουπεροξειδικών ανιόντων στα σύμπλοκα I και III, καθώς και τα κύρια μονοπάτια απομάκρυνσης των ROS. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα περιλαμβάνουν διάφορες ισομορφές της περοξυρεδοξίνης (PRX), τα δισμουτάσης του σουπεροξειδίου (SOD) και της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx). Κάποια μέλη των οικογενειών αυτών εντοπίζονται μέσα στα μιτοχόνδρια, ενώ άλλα βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ή στον εξωκυττάριο χώρο (Balaban RS et al., 2005).

### 1.1.2 Οφέλη των ROS

Μία ελεγχόμενη οξειδωτική κατάσταση στο κύτταρο είναι απαραίτητη για πολλές σημαντικές φυσιολογικές διαδικασίες. Σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις οι ROS δρουν ως όπλα του αμυντικού συστήματος του ξενιστή. Πράγματι, τα φαγοκύτταρα απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες προκειμένου να καταστρέψουν τα παθογόνα-εισβολείς (Pham-Huy LA et al., 2008).

Επίσης, οι περισσότεροι κυτταρικοί τύποι παρουσιάζουν μία μικρή οξειδωτική «έκρηξη» παράγοντας μικρές συγκεντρώσεις ROS μετά τη δράση κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων και ορμονών (Kirlin WG et al., 1999; Lee AC et al., 1999; Suh YA et al., 1999; Suzukawa K et al., 2000; Yeldandi AV et al., 2000). Το φαινόμενο αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι η εκκίνηση ή/ και η σωστή λειτουργία αρκετών σηματοδοτικών μονοπατιών βασίζεται στη δράση των ROS ως σηματοδοτικών μορίων. Συνεπώς, οι ROS διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό φυσιολογικό ρόλο ως δευτερογενείς αγγελιαφόροι (Valko M et al., 2007).

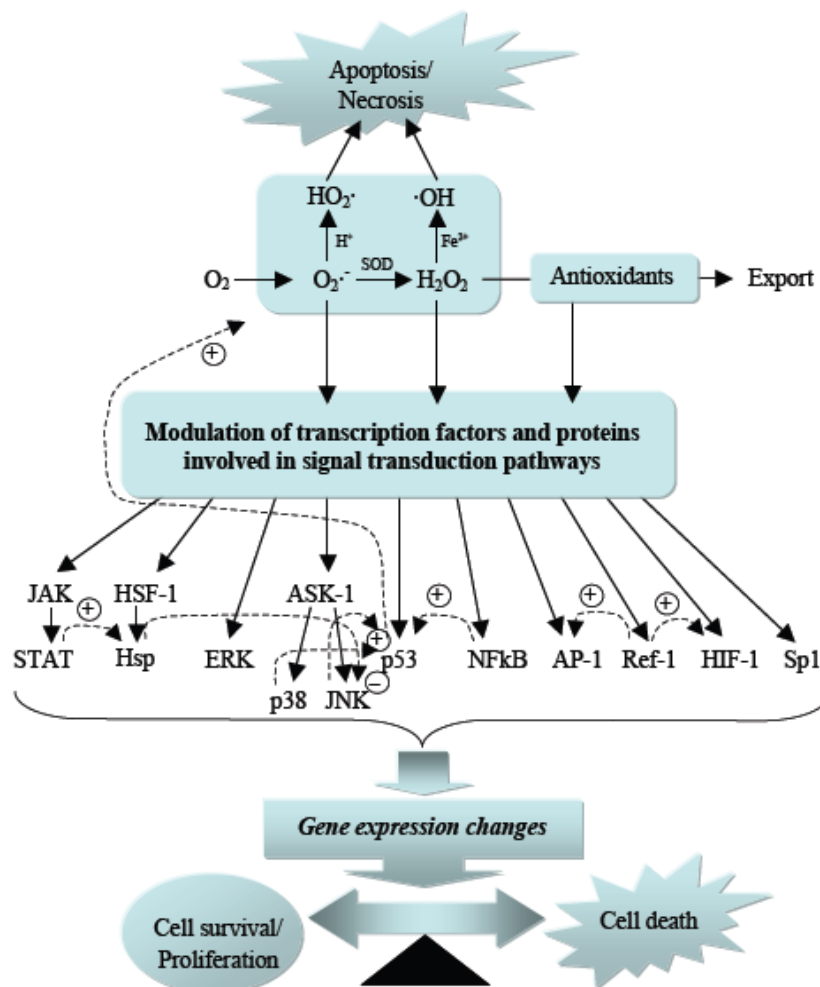
**Μονοπάτια κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων:** Έχει αναφερθεί ότι μία πληθώρα κυτοκινών (όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων, TNFα και η ιντερφερόνη γ, IFNγ) και αυξητικών παραγόντων (όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, EGF) οδηγούν στην ενδοκυττάρια παραγωγή ROS (Valko M et al., 2007). Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι ROS στα παραπάνω μονοπάτια μπορούν να δράσουν σαν πραγματικοί δευτερογενείς αγγελιαφόροι διαμεσολαβώντας σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες (π.χ. πολλαπλασιασμό και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο).

**Κινάσες τυροσίνης:** Οι ROS μπορούν να ενεργοποιήσουν κάποιες πρωτεϊνικές κινάσες της Src ή της JAK (Janus κινάση) οικογένειας. Για παράδειγμα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και το ανιόν του σουπεροξειδίου επάγουν τη φωσφορυλίωση των παραπάνω κινασών σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (π.χ. ινοβλάστες, μακροφάγα). Η ενεργοποιημένη Src δένει στη μεμβράνη και εκκινεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια των κινασών που ρυθμίζονται από μιτογόνα σήματα (MAPK), του πυρηνικού παράγοντα που ενισχύει την κάππα ελαφρά αλυσίδα των ενεργοποιημένων B κυττάρων (NF-κB) και της κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης-3 (PI3K) (Abe J and Berk BC, 1999).

**Φωσφατάσες Πρωτεϊνικής τυροσίνης (PTPs):** Οι PTPs μάλλον αποτελούν τους καλύτερα χαρακτηρισμένους άμεσους στόχους των ROS. Η αντιστρεπτή απενεργοποίηση των PTPs από τις ROS εμπλέκεται στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση και στην κυτταρική σηματοδότηση. Οι ROS εκδηλώνουν τη δράση τους στοχεύοντας στα κυστεϊνικά κατάλοιπα των ενεργών κέντρων των PTPs (Salmeen A and Barford D, 2005).

**Κινάσες σερίνης/θρεονίνης:** Έχει δείχτεί ότι ο παράγοντας β1 νέκρωσης όγκων (TGFβ1) κινητοποιεί την παραγωγή ROS σε μία ποικιλία κυττάρων και συνήθως αναστέλλει την ανάπτυξη των περισσότερων κυττάρων-στόχων (Shaw M et al., 1998). Επίσης, φαίνεται ότι οι ROS επάγουν την απελευθέρωση ασβεστίου από τις ενδοκυττάρειες πηγές οδηγώντας στην ενεργοποίηση κινασών, όπως της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), που είναι μέλος των κινασών σερίνης/θρεονίνης (Parekh AB and Penner R, 1997). Τέλος, αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι και οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης της MAPK οικογένειας ρυθμίζονται από τις ROS (Iles KE and Forman HJ, 2002; Kyriakis JM and Avruch J, 2001).

**Μεταγραφικοί παράγοντες:** Οι ROS συμμετέχουν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την έκφραση πρωτεϊνών οι οποίες επιδιορθώνουν το DNA, ενδυναμώνουν το ανοσοποιητικό σύστημα, αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κατεστραμμένων κυττάρων και επάγουν την απόπτωση (**Εικόνα 3**). Ενδεικτικά, οι ROS έχουν εμπλακεί στην ενεργοποίηση του NF-κB, της πρωτεΐνης1-ενεργοποιητή (AP-1), του p53 και του παράγοντα-1 που επάγεται από την υποξία (HIF-1) (Valko M et al., 2007). Ο NF-κB συμμετέχει σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις, η AP-1 είναι σημαντική για την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, ενώ η δυσλειτουργία του p53 έχει συσχετιστεί με περισσότερους από τους μισούς καρκίνους στον άνθρωπο. Ο HIF-1 αναλύεται εκτενέστερα στη συνέχεια.



**Εικόνα 3. Οξειδοαναγωγικά-ρυθμιζόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια.**

Οι οξειδοαναγωγικά ευαίσθητοι μεταγραφικοί παράγοντες εμπλέκονται σε ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια ρυθμίζοντας την ισορροπία μεταξύ των πολλαπλασιαστικών και βλαβερών κυτταρικών αποκρίσεων. Οι τοξικές συγκεντρώσεις οδηγούν σε νεκρωτικό ή αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Σε πιο ήπιες συγκεντρώσεις, διάφορα αντιοξειδωτικά ένζυμα και οι ROS, κυρίως το σουπεροξειδικό ανιόν ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου, μπορούν να ρυθμίσουν αρκετές κινάσες που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια, καθώς και έναν αριθμό μεταγραφικών παραγόντων. Οι τελευταίοι με τη σειρά τους ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Τα ανωτέρω περιπλέκονται ακόμα περισσότερο λόγω της αλληλεπίδρασης μεταξύ των μονοπατιών και της ιδιαιτερότητας του κάθε κυτταρικού τύπου (Valko M et al., 2007).

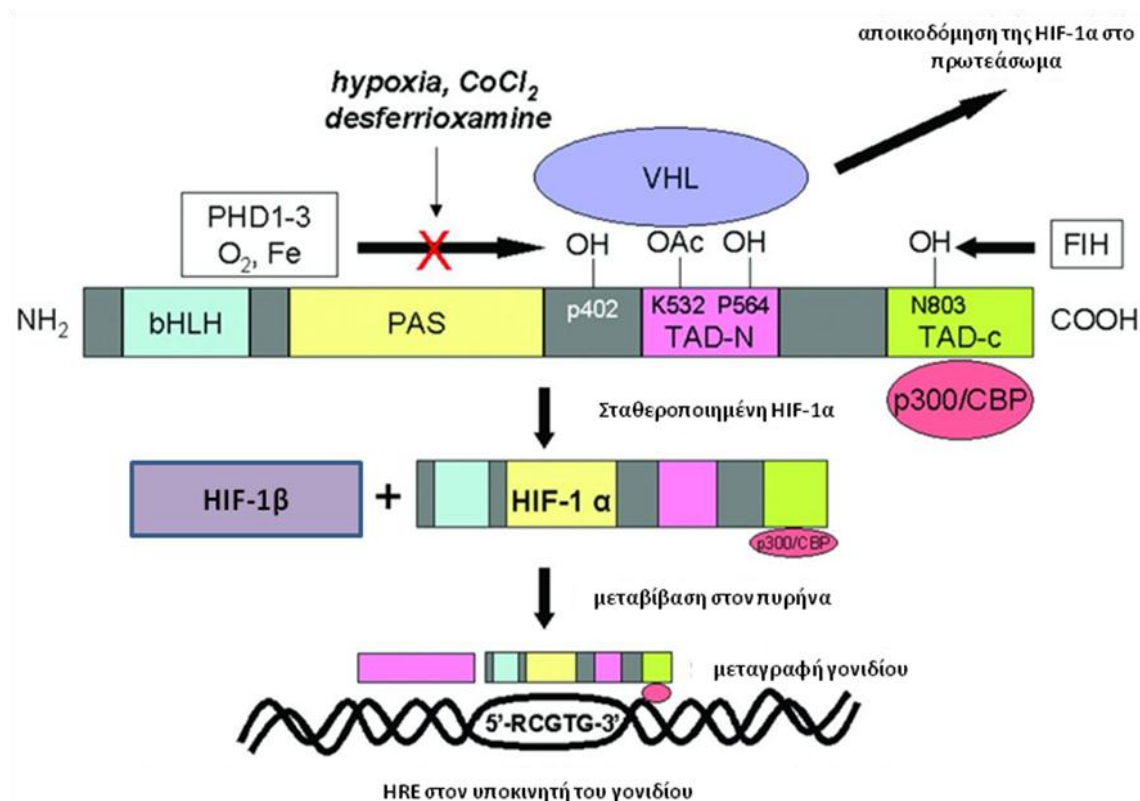
#### 1.1.2.1 HIF-1

Σε μοριακό επίπεδο, ο κύριος διακόπτης που ενορχηστρώνει την κυτταρική απόκριση στα χαμηλά επίπεδα  $O_2$  φαίνεται να είναι ο παράγοντας που επάγεται από την υποξία (hypoxia inducible factor HIF, **Εικόνα 4**) (Harris AL, 2002; Semenza GL, 2003). Η σημασία του HIF μονοπατιού μπορεί να διαπιστωθεί από το γεγονός ότι βρίσκεται ουσιαστικά σε όλους τους



κυτταρικούς τύπους και σε όλα τα ανώτερα ευκαρυωτικά (Huang M et al., 2002). Ο HIF είναι ετεροδιμερής και συντίθεται από την υπομονάδα HIF- $\alpha$ , της οποίας η έκφραση επάγεται ραγδαία κατά την υποξία και την υπομονάδα HIF-1 $\beta$  (που αποκαλείται και πυρηνικός μεταφορέας αρυλ-υδατανθράκων, ARNT), η οποία εκφράζεται συνεχώς (Semenza GL, 2001). Και οι δύο υπομονάδες ανήκουν στην ομάδα των μεταγραφικών παραγόντων με περιοχές βασικής έλικας-θηλειάς-έλικας (basic helix-loop-helix, bHLH) και PER-ARNT-SIM (PAS) (Wang GL et al., 1995). Οι περιοχές bHLH και PAS είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση στο DNA και το διμερισμό. Οι υπόλοιπες περιοχές των  $\alpha$  υπομονάδων περιλαμβάνουν μία  $O_2$ -εξαρτώμενη περιοχή αποικοδόμησης ( $O_2$ -dependent degradation domain, ODDD) και δύο περιοχές *trans* ενεργοποίησης. Τρεις δομικά συγγενικές  $\alpha$  υπομονάδες (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  και HIF-3 $\alpha$ ) έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα (Huang LE and Bunn HF, 2003). Ο HIF-1 που θα μας απασχολήσει στην παρούσα εργασία συνίσταται από τις HIF-1 $\alpha$  και HIF-1 $\beta$  υπομονάδες (Huang LE et al., 1996; Huang LE et al., 1998; Semenza GL, 2002; Wang GL et al., 1995).

Η HIF-1 $\alpha$  συσσωρεύεται κατά την υποξία και αποικοδομείται ταχύτατα κατά την επανοξυγόνωση (Jiang BH et al., 1996; Salceda S and Caro J, 1997; Wang GL et al., 1995). Υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, η HIF-1 $\alpha$  υδροξυλιώνεται σε μία εκ των δύο προλινών της ODDD (P402 και P564) από μία οικογένεια ενζύμων με περιοχή προλυλ-υδροξυλασής (prolyl hydroxylase domain proteins, PHDs). Οι PHDs, προκειμένου να είναι ενεργές, χρειάζονται  $O_2$ , το ενδιάμεσο του κύκλου του κιτρικού οξέος 2-Οξογλουταρικό (2-Oxoglutarate, 2OG) ως συν-υπόστρωμα, καθώς και Fe(II) και ασκορβικό ως συμπαραγόντες (Bruick RK and McKnight SL, 2001; Epstein AC et al., 2001). Η ανάγκη για σίδηρο εξηγεί γιατί οι χηλικοί παράγοντες και οι ανταγωνιστές του σιδήρου (π.χ. το  $CoCl_2$ ) έχουν δράσεις που μιμούνται αυτές της υποξίας. Οι υδροξυλιωμένες προλίνες καθιστούν εφικτή την αναγνώριση της HIF- $\alpha$  από την πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (VHL) (Ivan M et al., 2001; Jaakkola P et al., 2001) η οποία δρα ως E3 λιγάση ουβικιτίνης της HIF- $\alpha$  (Kondo K and Kaelin WG, 2001). Η υδροξυλίωση μόνο μίας εκ των δύο προλινών από τις PHDs αρκεί για την αναγνώριση από τη VHL, καθώς η μεταλλαγή μίας μόνο προλίνης σταθεροποιεί τη HIF- $\alpha$  εν μέρει, ενώ η μεταλλαγή και των δύο αυξάνει αξιοσημείωτα τη σταθερότητα και δράση της (Masson N et al., 2001). Την πρόσδεση της υδροξυλιωμένης HIF- $\alpha$  στη VHL ακολουθεί γρήγορη πολύουβικιτίνωση και τελικά μετατόπισή της και αποικοδόμηση στο 26S πρωτεάσωμα (Maxwell PH et al., 1999). Υπό υποξικές συνθήκες ή κατά τη χηλίωση του σιδήρου, η ενζυμική αναστολή των PHDs δεν επιτρέπει την αναγνώριση από τη VHL και την αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα, οδηγώντας στη σταθεροποίηση της HIF-1 $\alpha$ . Εν συνεχεία, η HIF-1 $\alpha$  μεταβαίνει και συσσωρεύεται στον πυρήνα, όπου διμερίζεται με τη HIF-1 $\beta$  και προσελκύει το μεταγραφικό συν-ενεργοποιητή p300/πρωτεΐνη που δένει στην CREB (CREB binding protein, CBP) cAMP, σχηματίζοντας το ενεργό HIF σύμπλοκο (Carrero P et al., 2000; Kung AL et al., 2000; Mole DR et al., 2001). Αυτό το σύμπλοκο προσδένεται στα στοιχεία που αποκρίνονται στο HIF (HIF-responsive elements, HREs) του υποκινητή, αυξάνοντας μία πλειάδα γονιδίων-στόχων, συμπεριλαμβανομένων μεταβολικών ενζύμων, αναπτυξιακών παραγόντων, κυτοκινών, υποδοχέων και άλλων σηματοδοτικών πρωτεϊνών (Semenza GL, 1999).



**Εικόνα 4.** Ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α από τη συγκέντρωση οξυγόνου.

Σε φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου, η HIF-1α υπόκειται σε άμεση αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα, μόλις σχηματίσει το σύμπλεγμα με τη VHL και το υπόλοιπο σύμπλοκο της E3 λιγάσης. Αυτό απαιτεί την υδροξυλίωση σημαντικών καταλοίπων προλίνης από την οικογένεια των PHDs, η οποία απαιτεί  $\text{O}_2$  και διάφορους συμπαραγόντες, συμπεριλαμβανομένου του σιδήρου. Κατά την υποξία ή τη χηλίωση του σιδήρου ή όταν αναστέλλεται ανταγωνιστικά, η υδροξυλίωση δε λαμβάνει χώρα, οπότε σταθεροποιείται η HIF-1α και μπορεί να αλληλεπιδράσει με τη συνεχώς εκφραζόμενη HIF-1β. Το σύμπλοκο του HIF-1, που σχηματίζεται στον πυρήνα, ενεργοποιεί γονίδια με στοιχεία απόκρισης στην υποξία στους υποκινητές τους. PAS: PER-ARNT-SIM, TAD: περιοχή ετερόπλευρης ενεργοποίησης (Hitchon CA and El-Gabalawy HS, 2004).

Το 2001 δείχτηκε ότι η δραστηριότητα του HIF-1 ρυθμίζεται και στον πυρήνα από τον παράγοντα που αναστέλλει το HIF-1 (factor-inhibiting HIF-1, FIH-1) (Mahon PC et al., 2001). Όπως και οι PHDs, ο FIH-1 είναι μέλος της οικογένειας των υδροξυλασών που εξαρτώνται από  $\text{Fe(II)}$  και 2OG. Υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, ο FIH-1 υδροξυλιώνει ένα συγκεκριμένο κατάλοιπο ασπαραγίνης στην κυτταροπλασματική περιοχή *trans* ενεργοποίησης της HIF-1α, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η προσέλευση του p300/CBP και συνεπώς, να αναστέλλεται η μεταγραφική ενεργότητα της HIF-1α (Hewitson KS et al., 2002; Koivunen P et al., 2004; Lando D et al., 2002; Lee C et al., 2003; McNeill LA et al., 2002).

Η ευαισθησία της HIF-1α ρυθμίζεται από το ισοζύγιο αντιοξειδωτικών/προ-οξειδωτικών στο κύτταρο. Ένα αυξημένο επίπεδο ανηγμένης γλουταθειόνης (δηλαδή του αντιοξειδωτικού τριπεπτιδίου γ-γλουταμυλ-κυστεϊνυλ-γλυκίνης, το οποίο θα αναλυθεί εκτεταμένα στη συνέχεια) συσχετίζεται με αυξημένη ενεργότητα πρόσδεσης του HIF-1 στο DNA, ενώ οι αυξημένες προ-

οξειδωτικές συνθήκες αναστέλλουν αυτήν την ενεργότητα (Haddad JJ et al., 2000). Όπως, επίσης, θα αναφερθεί στη συνέχεια, έχει προταθεί ένας ρόλος για όλο το σύστημα της θειορεδοξίνης στη ρύθμιση του παραπάνω παράγοντα (Ema M et al., 1999; Moos PJ et al., 2003; Welsh SJ et al., 2002).

### 1.1.3 Οξειδωτικό Στρες

Η παραγωγή των ROS και των RNS σε μη-φυσιολογική περίσσεια, σε λάθος θέση και χωρίς επαρκή αντιοξειδωτική προστασία, μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ευνοώντας τα προ-οξειδωτικά. Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται οξειδωτικό στρες.

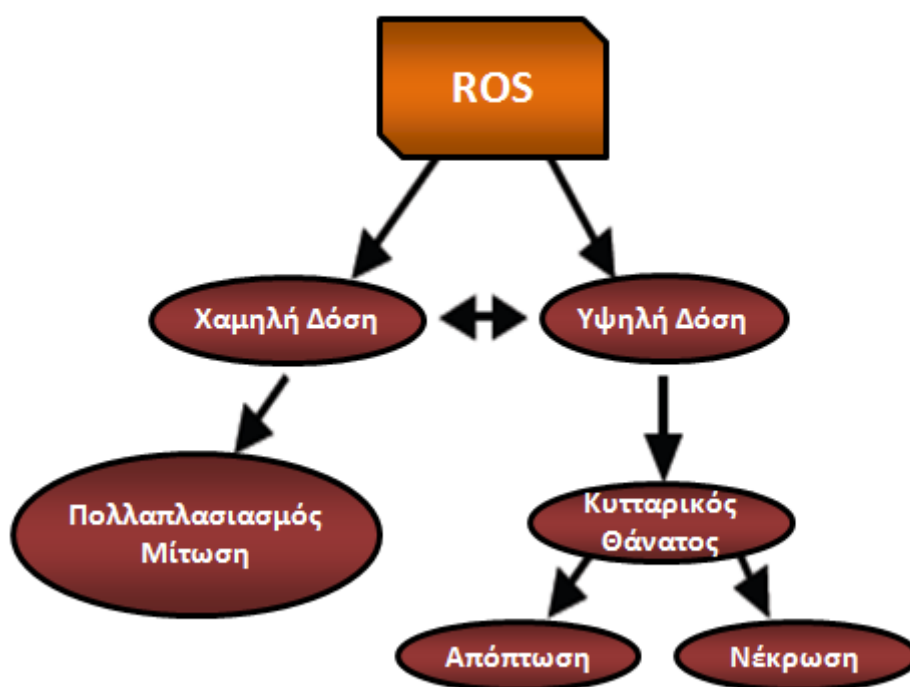
Οι υψηλές συγκεντρώσεις ROS αποτελούν σημαντικούς διαμεσολαβητές βλάβης σε κυτταρικές δομές, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και πρωτεΐνες (Valko M et al., 2006). Οι δραστικές μορφές επιτίθενται τόσο στις βάσεις όσο και στα τμήματα σακχάρου των νουκλεϊκών οξέων δημιουργώντας ρήξεις μονής και διπλής έλικας στο σκελετό, συμπλέγματα μεταξύ των ομάδων της βάσης και του σακχάρου και διασυνδέσεις με άλλα μόρια, βλάβες που εμποδίζουν την αντιγραφή (Sies H, 1993; Sies H and Menck CF, 1992). Στην περίπτωση των λιπιδίων, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να επιτεθούν απευθείας στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των μεμβρανών και να ξεκινήσει η λιπιδική υπεροξείδωση. Η κύρια δράση της είναι μία μείωση στη μεμβρανική ρευστότητα, η οποία αλλάζει τις μεμβρανικές ιδιότητες και μπορεί να διασπάσει τις μεμβρανικές πρωτεΐνες. Έτσι, σχηματίζονται περισσότερες ρίζες και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποικοδομούνται σε μία ποικιλία προϊόντων. Κάποια από αυτά, όπως οι αλδεΐδες, είναι ιδιαίτερα δραστικά και μπορούν να βλάψουν άλλα μόρια (π.χ. πρωτεΐνες) (Humphries KM and Sweda LI, 1998). Οι αλδεΐδες μπορούν να διαχέονται από τη θέση παραγωγής τους και να επιτίθενται σε απομακρυσμένους στόχους, δρώντας στην ουσία ως «δεύτεροι τοξικοί αγγελιαφόροι» των περίπλοκων αυτών αλυσιδωτών αντιδράσεων. Οι πρωτεΐνες αποτελούν περισσότερο από το 50% του ξηρού βάρους των κυττάρων και είναι ιδιαίτερα ευάλωτες σε οξειδωτικές μετατροπές. Η οξείδωση των πρωτεϊνών περιλαμβάνει: οξείδωση σουλφυδρυλο-ομάδων (η πλέον συχνή πρωτεϊνική μετατροπή), οξειδωτική προσαγωγή (adduction) αμινοξικών καταλοίπων κοντά σε θέσεις πρόσδεσης μετάλλων μέσω μεταλλο-καταλυόμενης οξείδωσης, αντιδράσεις με αλδεΐδες, τροποποίηση προσθετικών ομάδων ή συστάδων μετάλλου, διασυνδέσεις μεταξύ πρωτεϊνών και κατακερματισμό του πεπτιδίου. Η οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυτταρικών πρωτεϊνών αποτελεί ζωτικό μεσολαβητή πολλών μεταβολικών σηματοδοτικών και μεταγραφικών διαδικασιών στα κύτταρα και οι πρωτεϊνικές θειόλες στη μορφή των κυστεϊνικών καταλοίπων κατέχουν ρόλο-κλειδί στην οξειδοαναγωγική ανίχνευση και ρύθμιση (Koharyova M and Kolarova M, 2008).



Εικόνα 5. Ασθένειες επαγόμενες από το οξειδωτικό στρες στον άνθρωπο (Pham-Huy LA et al., 2008).

Το οξειδωτικό στρες έχει εμπλακεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις (**Εικόνα 5**), όπως σε καρδιαγγειακές νόσους, καρκίνους, νευρολογικές διαταραχές, διαβήτη, ισχαιμία/επανεμποτισμό, άλλες ασθένειες και στη γήρανση (Alexander RW, 1995; Araujo V et al., 1998; Baynes JW, 1991; Kollar B et al., 2006; Lee WL and Downey GP, 2001; Lesur O et al., 1999; Rigatto C and Singal PK, 1999; Schweizer U et al., 2004; Varsik P et al., 2006; Varsik P et al., 2005a; Varsik P et al., 2005b; Young LD et al., 2004). Οι παραπάνω ασθένειες ανήκουν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει ασθένειες στις οποίες τα προ-οξειδωτικά αλλοιώνουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση θειόλης/δισουλφιδίου και την ανοχή γλυκόζης-οι αποκαλούμενες συνθήκες μιτοχονδριακού οξειδωτικού στρες (καρκίνος και σακχαρώδης διαβήτης). Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από ασθένειες που χαρακτηρίζονται από φλεγμονώδεις οξειδωτικές συνθήκες και αυξημένη ενεργότητα είτε της NAD(P)H οξειδάσης (που οδηγεί σε αρτηριοσκλήρυνση και χρόνια φλεγμονή) είτε της οξειδάσης της ξανθίνης (που εμπλέκεται στη βλάβη μετά την ισχαιμία/επανεμποτισμό) (Valko M et al., 2007).

Η διαφορά μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της οξειδοαναγωγικής ρύθμισης (**Εικόνα 6**) θεωρείται συχνά ως ποσοτική (π.χ. χαμηλά επίπεδα ROS είναι ρυθμιστικά, υψηλά επίπεδα προκαλούν οξειδωτικό στρες και τοξικότητα) ή ποιοτική (η αντιστρεπτή οξείδωση κυστεϊνών προς μικτά δισουλφίδια αντιπροσωπεύει οξειδοαναγωγική ρύθμιση, ενώ η αμετάκλητη οξείδωση σε σουλφονικά οξέα αποτελεί τοξικό οξειδωτικό στρες) (Dalton TP et al., 1999; Martindale JL and Holbrook NJ, 2002; Thannickal VJ and Fanburg BL, 2000).



**Εικόνα 6. Κυτταρικές αποκρίσεις στις ROS.**

Η απόκριση εξαρτάται από τη συγκέντρωση, το είδος των ROS, τη διάρκεια της έκθεσης και τον κυτταρικό τύπο.

#### 1.1.4 Αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά εξουδετερώνουν την περίσσεια των ROS, προστατεύουν τα κύτταρα από την τοξική τους δράση και συνεισφέρουν στην πρόληψη ενάντια στις ασθένειες. Τα αντιοξειδωτικά που παράγει ο οργανισμός μπορούν να διακριθούν σε ενζυμικά και μη-ενζυμικά (Pham-Huy LA et al., 2008).

Οι ενζυμικές αντιοξειδωτικές άμυνες περιλαμβάνουν τη δισμουτάση του σουπεροξειδικού ανιόντος (SOD), την περοξειδάση γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, GSHPx), την καταλάση (catalase, CAT) και τις θειορεδοξίνες (thioredoxins, TRXs) (Pham-Huy LA et al., 2008). Τα μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά διακρίνονται στα ενδογενή, τα οποία παράγει ο οργανισμός και σε εκείνα τα οποία δεν μπορεί να συνθέσει ο οργανισμός και παρέχονται από τις τροφές ή από συμπληρώματα διατροφής. Το λιποϊκό όξύ, η γλουταθειόνη, η L-αργινίνη, το συνένζυμο Q10, η μελατονίνη και το ουρικό οξύ ανήκουν στην πρώτη κατηγορία. Από την άλλη, οι βιταμίνες E και C, τα καρτενοειδή, τα φλαβονοειδή και τα λιπαρά οξέα ωμέγα 3 και 6 ανήκουν στα εξωγενή αντιοξειδωτικά (Pham-Huy LA et al., 2008).

## 1.2 Η ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΩΝ

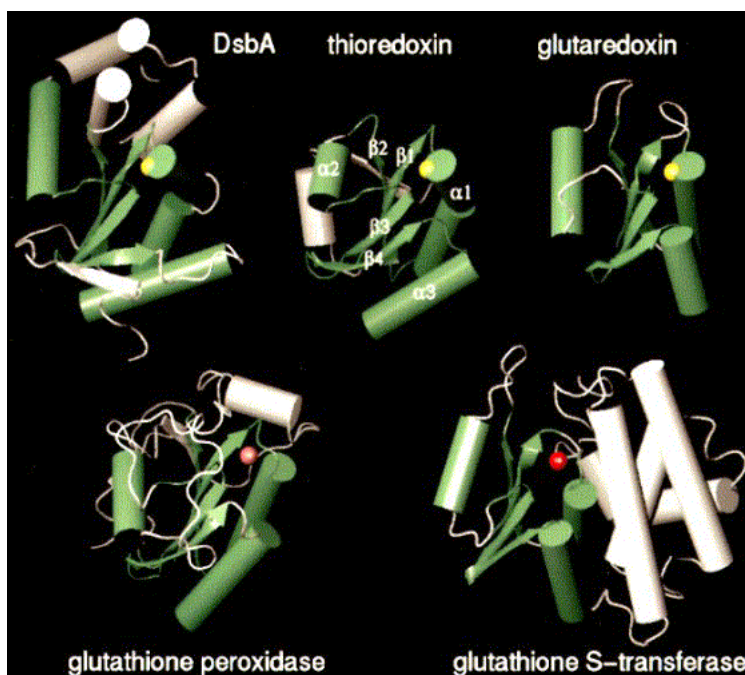
Οι πρωτεΐνες στον εξωκυττάριο χώρο ή στην κυτταρική επιφάνεια είναι πλούσιες σε σταθεροποιητικά δισουλφίδια, αντανακλώντας τις οξειδωτικές συνθήκες. Αντίθετα, το εσωτερικό

του κυττάρου διατηρείται ανηγμένο και είναι σπάνιες οι πρωτεΐνες με πολλά δισουλφίδια (Gilbert HF, 1990). Υπεύθυνη για τη διατήρηση των πρωτεϊνών στην ανηγμένη τους κατάσταση είναι κυρίως η θειορεδοξίνη (TRX), μία πανταχού παρούσα αναγωγάση δισουλφιδίων, η οποία ανάγεται από ηλεκτρόνια του NADPH μέσω της αναγωγάσης της θειορεδοξίνης (thioredoxin reductase, TRXR) (Holmgren A, 1985). Ο άλλος σημαντικός παράγοντας που είναι εν γένει υπεύθυνος για τη διατήρηση του χαμηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού και του υψηλού επιπέδου -SH μέσα στο κύτταρο είναι η γλουταθειόνη (GSH) που βρίσκεται σε συγκεντρώσεις millimolar και διατηρείται ανηγμένη από το NADPH και την αναγωγάση της γλουταθειόνης (glutathione reductase, GR) (Gilbert HF, 1990; Williams CH Jr, 1992). Οι GSH-εξαρτώμενες αναγωγές δισουλφιδίων καταλύονται από τις γλουταρεδοξίνες (GRXs) που επικαλύπτουν μέρος των λειτουργιών των TRXs και, επιπλέον, είναι σχεδόν αποκλειστικά ενεργές με μικτά δισουλφίδια με GSH (Holmgren A, 1989).

Ο έλεγχος της οξειδοαναγωγής των θειολών προβλέπει ότι οι θειόλες που οξειδώνονται σε δισουλφίδια μπορεί να επηρεάσουν τη δομή και τη δραστικότητα πρωτεϊνών (Holmgren A, 1989). Σε γενικές γραμμές, οι δισουλφιδικοί δεσμοί σταθεροποιούν τη δομή των πρωτεϊνών (π.χ. αλβουμίνη ορού βοοειδών), ενώ η βιολογική δραστικότητα των πρωτεϊνών μπορεί επίσης να επηρεαστεί (π.χ. OxyR). Σε ορισμένες οξειδοαναγωγάσες, ο σχηματισμός και η αναγωγή των δισουλφιδίων είναι ουσιαστικής σημασίας για την ενζυμική ενεργότητα ως μέρος ενός καταλυτικού μηχανισμού [π.χ. αναγωγάση ριβονουκλεοτιδίων και αναγωγάση 3-φωσφοαδενυλοσουλφικού (3'-phosphoadenylylsulfate, PAPS)]. Αυτός ο μηχανισμός οξειδοαναγωγικού ελέγχου (redox control) των θειολών έχει εξελιχθεί σε κύριο ρυθμιστικό μηχανισμό στη μεταγωγή σήματος.

Πρωταγωνιστικό ρόλο στο μηχανισμό του οξειδοαναγωγικού ελέγχου διαδραματίζουν οι TRX και GRX, που αποτελούν μέλη της υπεροικογένειας των θειορεδοξινών.

**Γενικά χαρακτηριστικά της υπεροικογένειας:** Η υπεροικογένεια των θειορεδοξινών συνίσταται από μία ευρεία συλλογή πρωτεϊνικών οικογενειών που συνδέονται από την παρουσία μίας κοινής δομικής αναδίπλωσης, της αναδίπλωσης της θειορεδοξίνης (Clissold PM and Bicknell R, 2003). Η αναδίπλωση της θειορεδοξίνης (thioredoxin fold) εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 1975 (Holmgren A et al., 1975) από την κρυσταλλική δομή της οξειδωμένης TRX1 της *E. coli* και χαρακτηρίζεται από έναν κεντρικό πυρήνα τεσσάρων ή πέντε β-πτυχωτών επιφανειών (stranded mixed  $\beta$ -sheet), ο οποίος πλαισιώνεται από τρεις ή τέσσερις  $\alpha$ -έλικες ( $\alpha$ -helices) (**Εικόνα 7**).



**Εικόνα 7. Δομική σύγκριση πέντε πρωτεϊνών με την TRX αναδίπλωση.**

Απεικονίζονται οι δομές των DSBΑ, θειορεδοξίνης, γλουταρεδοξίνης, περοξυδάση γλουταθειόνης (GSHPx) και S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST). Τα τμήματα κάθε δομής που απαρτίζουν την αναδίπλωση της θειορεδοξίνης απεικονίζονται με πράσινο, ενώ τα υπόλοιπα δομικά χαρακτηριστικά με γκρι. Τα άτομα που αλληλεπιδρούν με το κατάλοιπο κυστεΐνης του υποστρώματος παρουσιάζονται σαν έγχρωμες σφαίρες -οι κίτρινες υποδεικνύουν το άτομο θείου της N-τελικής κυστεΐνης του CXXC μοτίβου των TRX, GRX και DSBA, οι ροζ το σελήνιο της σεληνοκυστεΐνης της GSHPx και οι κόκκινες το οξυγόνο της υδροξυλο-ομάδας της τυροσίνης της GST .

Παράλληλα, οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες αυτές έχουν ενεργό κέντρο που περιλαμβάνει το μοτίβο CXXC, το οποίο είναι απαραίτητο για την ενεργότητά τους (Quan S et al., 2007). Οι κυστεΐνες μπορούν αντιστρεπτά να δημιουργήσουν έναν δισουλφιδικό δεσμό, επιτρέποντας στα συγγενικά με την TRX μόρια να συμμετέχουν σε αντιδράσεις ανταλλαγής δισουλφιδίου. Η αλληλουχία του XX διπεπτιδίου που βρίσκεται ανάμεσα στις κυστεΐνες είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον έλεγχο των οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων της πρωτεΐνης στην οποία ανήκει, σε βαθμό που να χαρακτηρίζεται ως ένας οξειδοαναγωγικός ρεοστάτης (Quan S et al., 2007). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι είναι πιθανό να αλλάξουν οι οξειδοαναγωγικές ιδιότητες αυτών των οξειδοαναγωγικών μεταλλάσσοντας το XX διπεπτιδίο στο CXXC μοτίβο (Quan S et al., 2007).

Η αναδίπλωση της θειορεδοξίνης έχει βρεθεί σε δέκα πρωτεϊνικές οικογένειες: TRXs, GRXs, περοξυρεδοξίνες, DSB πρωτεΐνες (disulfide bond proteins, πρωτεΐνες δισουλφιδικού δεσμού) (Collet JF and Bardwell JCA, 2002), Dim1 πρωτεΐνες (Zhang YZ et al., 1999), Sco1/2 πρωτεΐνες (Balatri E et al., 2003), PDIs (protein disulfide isomerases, ισομεράσες πρωτεϊνικών δισουλφιδίων), GST (glutathione S-transferase, S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης), GSHPx (Ferrari DM and Sfling HD, 1999; Martin JL, 1995) και σεληνοαποϊωδινάσες ιωδοθυρονίνης (iodothyronine selenodeiodinases) (Callebaut I et al., 2003). Οι GST και GSHPx δεν έχουν το

παραπάνω μοτίβο στο ενεργό τους κέντρο, ωστόσο μοιράζονται με τις GRXs μία ειδική αλληλεπίδραση με την GSH.

<b>Πίνακας 1. Τυπικές Μοριακές Λειτουργίες Οικογενειών της TRX Υπεροικογένειας</b>	
<b>Θειορεδοξίνη (TRX)</b>	Αναγωγή πρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών (Holmgren A et al., 2005)
<b>Περοξειδάσες Γλουταθειόνης (GSHPx)</b>	Αναγωγή Υπεροξειδίων (Torro S et al., 2008)
<b>Περοξυρεδοξίνες (AhpC-TSA, Redoxin, PRX)</b>	Αναγωγή Υπεροξειδίων (Poole LB, 2007; Wood ZA et al., 2003)
<b>SCO (SCO1-SenC)</b>	Πρόσδεση στο ιόν του χαλκού; Ενεργότητα οξειδοαναγωγής θειόλης-δισουλφιδίου (Banci L et al., 2008)
<b>DSB (DSBA)</b>	Σχηματισμός πρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών (Ito K and Inaba K, 2008)
<b>ARSC</b>	Αναγωγή Αρσενικού (Messens J and Silver S, 2006)
<b>Γλουταρεδοξίνη (GRX)</b>	Αναγωγή πρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών; Απογλουταθειονυλίωση πρωτεϊνών (Fernandes AP and Holmgren A, 2004; Herrero E and de la Torre-Ruiz MA, 2007)
<b>S-Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης (GST)</b>	Προσθήκη Γλουταθειόνης σε μικρά μόρια; Αναγωγή Υπεροξειδίων (Armstrong RN, 1997)
<b>Ισομεράση των Πρωτεϊνικών Δισουλφιδίων (PDI)</b>	Οξειδωση δισουλφιδικών δεσμών; Ισομερισμός (Gilbert HF, 1998)

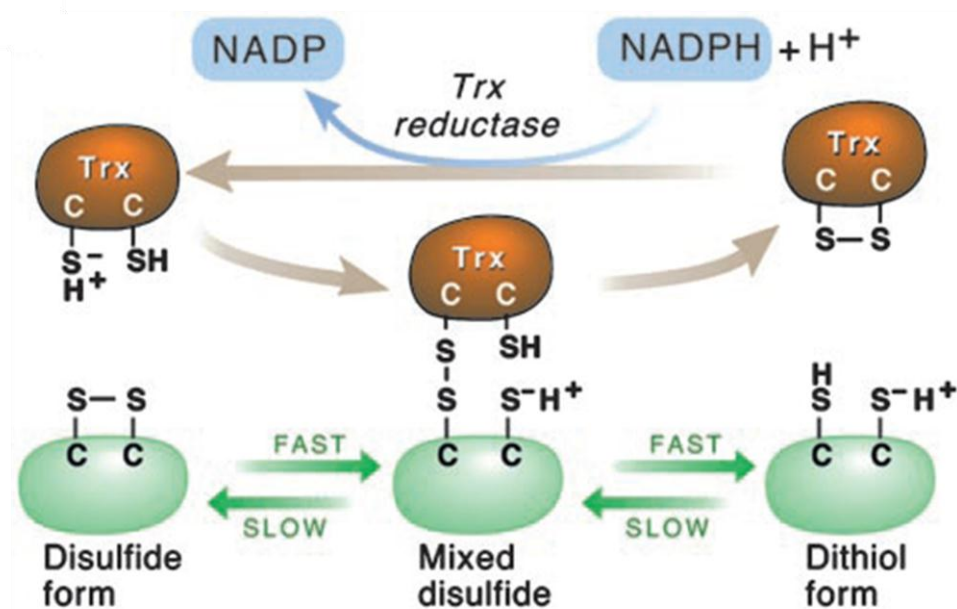
Οι πρωτεΐνες της υπεροικογένειας των θειορεδοξινών, αν και έχουν αξιοσημείωτη δομική ομοιότητα, παρουσιάζουν περιορισμένη ομολογία αλληλουχίας, ενώ έχουν ένα ευρύ φάσμα οξειδοαναγωγικών ενεργοτήτων (**Πίνακας 1**). Αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα του πώς, συχνά, η φύση χρησιμοποιεί το ίδιο «καλούπι» σε λειτουργικά συγγενικές πρωτεΐνες και τροποποιεί την κοινή αρχιτεκτονική προκειμένου να προκύψουν διαφορετικές λειτουργικότητες. Οι θειορεδοξίνες, λοιπόν, είναι εν γένει αναγωγάσες δισουλφιδίων. Ωστόσο, η οξειδωτική DsbA καταλύει το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών στο περίπλασμα της *E.coli* (Ito K and Inaba K, 2008). Η ευκαρυωτική ισομεράση των πρωτεϊνικών δισουλφιδίων (PDI) εντοπίζεται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, περιέχει τέσσερις περιοχές θειορεδοξίνης και καταλύει την οξειδωση των δισουλφιδικών δεσμών και τον ισομερισμό (Gilbert HF, 1998). Οι GSTs δεν περιέχουν διθειόλες στο ενεργό κέντρο, ενώ η δράση τους είναι να ενεργοποιούν την GSH για να



επιτίθεται σε ξενοβιοτικά υποστρώματα (Armstrong RN, 1997). Συνοψίζοντας, μέλη της υπεροικογένειας της TRX έχουν βρεθεί σε όλους τους οργανισμούς και εμπλέκονται στην άμυνα στο οξειδωτικό στρες (Holmgren A et al., 2005), στην πρωτεϊνική αναδίπλωση (Ito K and Inaba K, 2008) και στην ενζυμική αποτοξίνωση από ξενοβιοτικά (Armstrong RN, 1997).

### 1.2.1 Το Σύστημα της Θειορεδοξίνης

Συστήματα θειορεδοξίνης υπάρχουν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, από τους προκαρυωτικούς μέχρι και τους ευκαρυωτικούς και βρίσκονται ανάμεσα στα πλέον σημαντικά συστήματα οξειδοαναγωγικής ρύθμισης στο κύτταρο. Εμπλέκονται στη ρύθμιση πολυάριθμων διαδικασιών που βασίζονται στην ανταλλαγή θειόλης-δισουλφιδίου και έχουν πληθώρα σημαντικών λειτουργιών στη αντιοξειδωτική άμυνα (Gromer S et al., 2004; Holmgren A, 1985). Το σύστημα της θειορεδοξίνης (**Εικόνα 8**) περιλαμβάνει την 12-kDa πρωτεΐνη θειορεδοξίνη, που αποτελεί και το ιδρυτικό μέλος της οικογένειας και την αναγωγάση της.



Εικόνα 8. Οξειδοαναγωγικός κύκλος της TRX (Kumar JK et al., 2004).

#### 1.2.1.1 Θειορεδοξίνη (TRX)

Το ενεργό κέντρο της θειορεδοξίνης (CGPC) αποτελείται από δύο γειτονικές κυστεΐνες και μπορεί να εναλλάσσεται μεταξύ της ενεργής μορφής διθειόλης (ανηγμένη μορφή, TRX-SH<sub>2</sub>) και της οξειδωμένης δισουλφιδικής μορφής (TRX-S<sub>2</sub>). Στην ενεργή της μορφή, η θειορεδοξίνη δρα ως αποτελεσματικός αναγωγικός παράγοντας, απομακρύνοντας δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και διατηρώντας άλλες πρωτεΐνες στην ανηγμένη τους κατάσταση. Αφού οξειδωθεί, η δραστική θειορεδοξίνη αναγεννάται μέσω της δράσης της αναγωγάσης της θειορεδοξίνης (TRXR), χρησιμοποιώντας NADPH ως δότη ηλεκτρονίου (Holmgren A, 1989).

<b>Πίνακας 2: Ρόλος των Θειορεδοξινών σε Διαφορετικούς Οργανισμούς (Arner ES and Holmgren A, 2000)</b>		
<b>Οργανισμός</b>	<b>Ρόλος της TRX</b>	<b>Σχόλια</b>
<b>Όλοι οι οργανισμοί (?)</b>	Σύνθεση DNA	Η TRX αποτελεί δότη ηλεκτρονίων για την αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων.
	Αναγωγή πρωτεϊνικών δισουλφιδίων	Η TRX έχει πρωταγωνιστικό ρόλο στη διατήρηση των ενδοκυττάρων πρωτεϊνικών δισουλφιδίων εν γένει ανηγμένων.
<b>Πολλοί οργανισμοί</b>	Αναγωγή H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Πολλές περοξυρεδοξίνες, που καταλύουν την αναγωγή του H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> και έτσι αποτρέπουν το οξειδωτικό στρες και την επαγωγή της απόπτωσης, απαιτούν αναγωγή από την TRX.
	Επιδιόρθωση πρωτεϊνών μέσω αναγωγής του σουλφοξειδίου της μεθειονίνης	Η TRX αποτελεί δότη υδρογόνου για της αναγωγάσες του σουλφοξειδίου της μεθειονίνης.
<b>Φάγοι <i>E. coli</i> (T7, f1, M13)</b>	Υπομονάδα της T7 DNA πολυμεράσης Συμμετέχει στη συγκρότηση του νηματώδους φάγου	Αυξάνει την ενεργότητα.  Η TRX αποτελεί τη μόνη πρωτεΐνη του ξενιστή (της <i>E. coli</i> ) που απαιτείται για τη συγκρότηση και την έξοδο του φάγου.
<b>Βακτήρια και ζύμη</b>	Δότης υδρογόνου για την αναγωγή του 3'-φωσφοαδενοθυοθειικού (PAPS)	Αφομοίωση του θείου από την αναγωγή του θειϊκού σε θειώδες.
<b>Φυτά</b>	Ρύθμιση των φωτοσυνθετικών ενζύμων των χλωροπλαστών	Ρύθμιση της φωτοσύνθεσης μέσω της φερρεδοξίνης.
<b>Θηλαστικά</b>	Οξειδοαναγωγική ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων	Διαφορετικοί μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούνται ή αναστέλλονται από την TRX (π.χ. NF-κB, AP-1).
	Ρύθμιση της απόπτωσης	Η TRX-(SH) <sub>2</sub> , αλλά όχι η TRX-S <sub>2</sub> , σχηματίζει σύμπλοκο με την ASK1 αποτρέποντας την καταρροϊκή σηματοδότηση για την απόπτωση.
	Ανοσορύθμιση	Η εξωκυττάρια TRX είναι τόσο συν-κυτοκίνη όσο και χημοκίνη, ενώ η «ακρωτηριασμένη» μορφή ενεργοποιεί τα ηωσινόφιλα.
	Εγκυμοσύνη	Η ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια σύνθεση της TRX από τους κυτταροτροφοβλάστες συμβάλλει στην εμφύτευση.
	Τοκετός	Προστασία από την υπεροξία κατά τον τοκετό μέσω επαγωγής της TRX.
	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα	Η TRX που εκκρίνεται από τα κύτταρα της γλοίας προωθεί την επιβίωση των νευρώνων κατά την ισχαιμία/επανεμποτισμό.

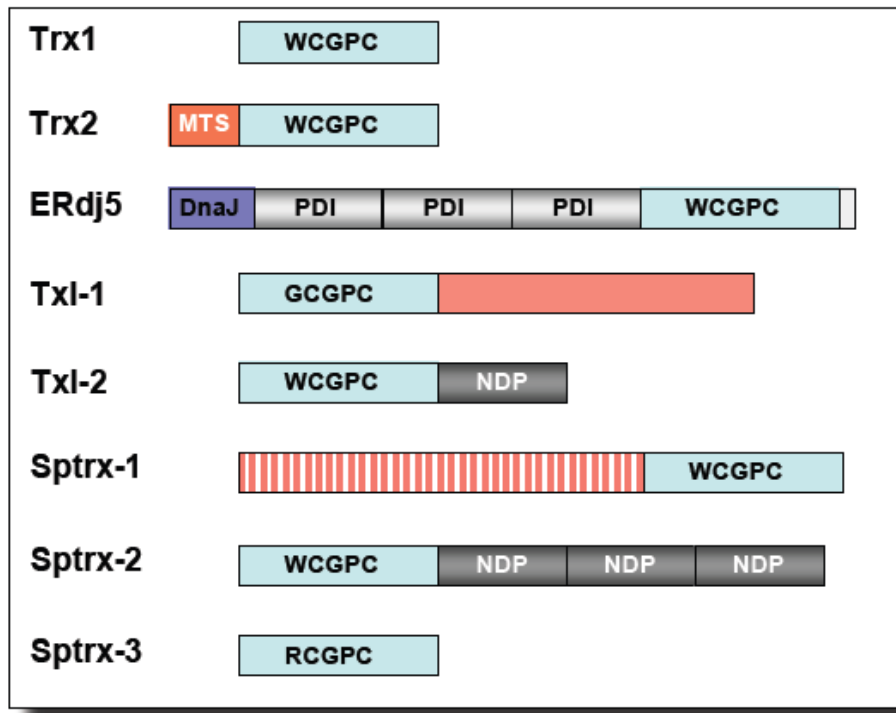
Η οξειδοαναγωγική ενεργότητα της TRX αντικατοπτρίζεται σε μία ποικιλία λειτουργιών, οι οποίες μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο κατηγορίες. Πρώτον, δρα ως φορέας ηλεκτρονίων παρέχοντας αναγωγικά ισοδύναμα για τους καταλυτικούς κύκλους βιοσυνθετικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως οι ριβονουκλεοτιδικές αναγωγάσες και οι περοξυρεδοξίνες. Δεύτερον, προστατεύει τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες από συσσωμάτωση και απενεργοποίηση λόγω του σχηματισμού ενδο- ή δια-μοριακών δισουλφιδίων. Πέρα από την αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα, οι TRXs έχουν πολλές άλλες λειτουργίες, κάποιες εκ των οποίων είναι πολύ εξειδικευμένες (υπομονάδα της T7 DNA πολυμεράσης, συγκρότηση του νηματοειδούς φάγου), ενώ κάποιες άλλες έχουν μεγάλη θεραπευτική σημασία, όπως για παράδειγμα, οι σημαντικές ρυθμιστικές τους επιδράσεις στην ανοσιακή απόκριση, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητάς τους να ελέγχουν την ικανότητα πρόσδεσης ανοσολογικά ενεργών μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. NF-κB και AP-1) (Arner ES and Holmgren A, 2000). Αρκετά παραδείγματα των λειτουργιών των θειορεδοξινών σε συγκεκριμένους οργανισμούς συνοψίζονται στον **Πίνακα 2**.

#### **1.2.1.1.1 Θειορεδοξίνες των Θηλαστικών**

Στα θηλαστικά έχουν ανακαλυφθεί δύο κατηγορίες TRXs (**Εικόνα 9**): εκείνες που φέρουν μόνο την περιοχή με την τυπική αναδίπλωση θειορεδοξίνης και εκείνες που συγχωνεύουν περιοχές όμοιες με των TRXs με άλλες περιοχές (Cunnea PM et al., 2003; Jimenez A et al., 2006; Jimenez A et al., 2004; Miranda-Vizuete A et al., 1998; Miranda-Vizuete A et al., 2001; Miranda-Vizuete A et al., 2004; Sadek CM et al., 2003; Yu Y et al., 2002).

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν δύο ισομορφές που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια: η κυτταροπλασματική/πυρηνική TRX1 και η μιτοχονδριακή TRX2 (στον άνθρωπο βρίσκονται στα χρωμοσώματα 9 και 22 αντίστοιχα) (Arner ES and Holmgren A, 2000). Εδώ ανήκει και μία ειδική «ακρωτηριασμένη» (truncated) μορφή TRX1, που εντοπίστηκε στην επιφάνεια των μονοκυττάρων, η αποκαλούμενη TRX80, η οποία αποτελείται από τα κατάλοιπα 1-80. Η TRX80 είναι πιθανότατα ίδια με την πρωτεΐνη που έχει περιγραφεί σαν παράγοντας ενίσχυσης της κυτταροτοξικότητας των ηωσινόφιλων (ECEP, eosinophil cytotoxicity-enhancing factor) και η οποία συμβάλλει στην ικανότητα των ηωσινόφιλων να σκοτώνουν τις λάρβες του *Schistosoma mansoni* (Lenzi HL et al., 1985; Silberstein DS et al., 1993).

Οι TRX1 και TRX2 είναι μέλη των αποκαλούμενων κυτταροπλασματικών και μιτοχονδριακών συστημάτων θειορεδοξίνης αντίστοιχα, τα οποία περιλαμβάνουν κυτταροπλασματική (TRXR1) και μιτοχονδριακή (TRXR2) TRXR και NADPH (Miranda-Vizuete A et al., 2000).



**Εικόνα 9: Θειορεδοξίνες των θηλαστικών.**

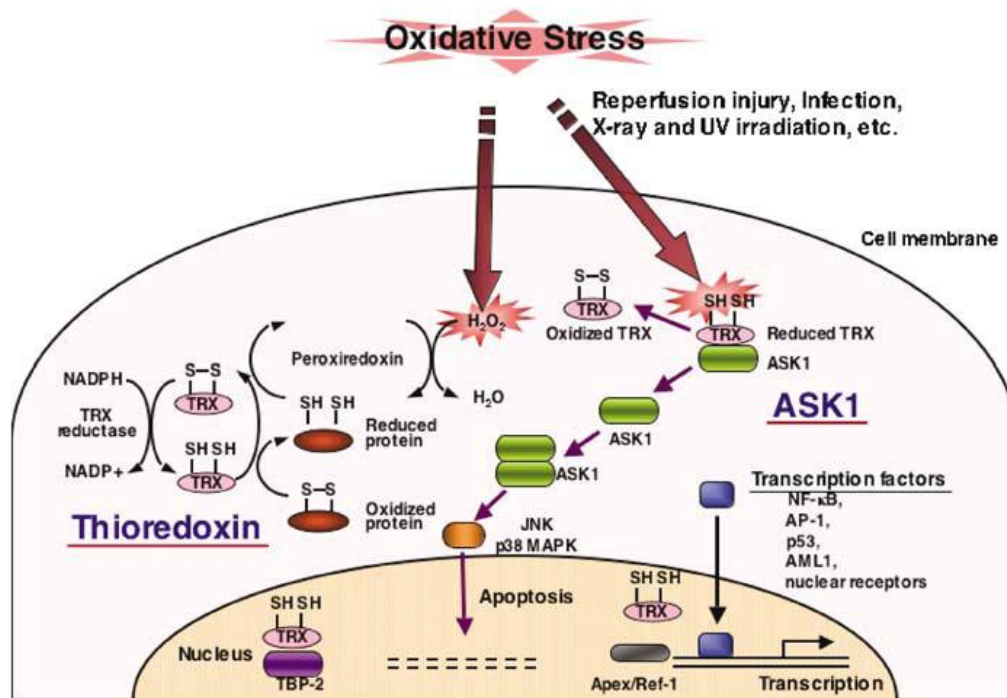
Οι TRX1 και TRX2 αντιστοιχούν στην κυτταροπλασματική/πυρηνική και μιτοχονδριακή θειορεδοξίνη. Αναλύονται διεξοδικά στο κείμενο. Η ERdj5 είναι μία πανταχού παρούσα πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αποτελείται από μία DnaJ περιοχή, που δρα ως συν-τσαπερόνιο της Hsp70, τρεις PDI περιοχές, υπεύθυνες για τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μία TRX περιοχή (Cunpea PM et al., 2003). Η Txl-1 (thioredoxin-like, πρωτεΐνη που μοιάζει με τη θειορεδοξίνη) εκφράζεται σε όλους τους ιστούς στον άνθρωπο, αποτελείται από μία αμινοτελική περιοχή 105 αμινοξέων, που είναι ομόλογη με των υπόλοιπων TRXs, με ένα GCGPC ενεργό κέντρο και από μία καρβοξυτελική περιοχή 184 αμινοξέων άγνωστης λειτουργίας (Jimenez A et al., 2006; Miranda-Vizuete A et al., 1998). Η Txl-2 αποτελείται επίσης από δύο διακριτές περιοχές: μία N-τελική που περιέχει ένα τυπικό TRX ενεργό κέντρο και μία C-τελική που ανήκει στην οικογένεια των κινάσων των διφωσφορικών νουκλεοσιδίων (NDP). Ωστόσο, δεν έχει ούτε ενεργότητα κινάσης NDP ούτε ικανότητα αναγωγής δισουλφιδικών δεσμών, ενώ έχει δειχθεί ότι προσδένεται στους μικροσωληνίσκους (Sadek CM et al., 2003). Οι Sptrx-1 και Sptrx-2 εκφράζονται ιστοειδικά στο σπέρμα με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης να παρουσιάζονται κατά την ωρίμανση του σπέρματος. Η Sptrx-1 έχει μία N-τελική περιοχή 23 υψηλά συντηρημένων επαναλήψεων ενός μοτίβου 15 καταλοίπων και μία C-τελική TRX περιοχή. Η Sptrx-2 έχει την TRX περιοχή στο N-τελικό άκρο, ενώ η C-τελική περιοχή αποτελείται από τρεις περιοχές NDP κινάσης (Miranda-Vizuete A et al., 2001; Miranda-Vizuete A et al., 2004; Yu Y et al., 2002). Η τρίτη Sptrx, η Sptrx-3, παρουσιάζει στενή ομολογία με την TRX1, με μία αλληλουχία RCGPC στο ενεργό της κέντρο, αλλά και αυτής η έκφραση περιορίζεται στο σπέρμα (Jimenez A et al., 2004).

**TRX1:** Η κυτταροπλασματική TRX1 των θηλαστικών αποτελεί μία πανταχού παρούσα πρωτεΐνη μοριακού βάρους 12 kDa που φέρει το χαρακτηριστικό μοτίβο WCGPC στο ενεργό της κέντρο (Holmgren A, 1968). Καθαρίστηκε για πρώτη φορά από το ήπαρ του αρουραίου το 1972 (Larson G and Larsson A, 1972), ενώ έκτοτε έχει απομονωθεί από αρκετά είδη, όπως από ανθρώπους, κοτόπουλα, βοοειδή και ποντίκια. Εάν και πρόκειται για μία κυρίως κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, μπορεί να μεταβεί και στον πυρήνα μετά την επίδραση διάφορων ουσιών που προκαλούν οξειδωτικό στρες (Ema M et al., 1999; Hirota K et al., 1997; Kabe Y et al., 2005; Makino Y et al., 1999; Masutani H et al., 1996; Wei SJ et al., 2000). Ακόμα, έχει τη δυνατότητα να εκκρίνεται μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού (Bertini R et al., 1999; Jikimoto T et al., 2002; Nakamura H et al., 2001b; Sumida Y et al., 2000; Yamada Y et al., 2003). Η TRX1 ανάγεται από την TRXR1, ένα φλαβοένζυμο που μεταφέρει αναγωγικά ισοδύναμα από το πυριμιδινικό νουκλεοτίδιο του NADPH στη θειορεδοξίνη (Holmgren A, 1985; Holmgren A, 1989; Holmgren A, 2000). Η έκφρασή της επάγεται από διάφορα είδη στρες, όπως  $H_2O_2$ , φορβολικούς εστέρες,  $O_2$ , υποξία, ικές μόλυνσεις, αυτοάνοσες φλεγμονές, UV και ακτινοβολία X (Berggren M et al., 1996; Das KC et al., 1999a; Das KC et al., 1999b; Fujii S et al., 1991a; Fujii S et al., 1991b; Nakamura H et al., 2001a; Rosen A et al., 1995; Sachi Y et al., 1995).

Πολυάριθμες λειτουργίες έχουν αποδοθεί στην TRX1, όπως:

- **Συμπαράγοντας στη σύνθεση DNA.** Η TRX1 παρέχει τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την αναγωγή της ριβόζης από την αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων, η οποία καταλύει τη μετατροπή των διφωσφορικών νουκλεοτιδίων σε δεοξυριβονουκλεοτίδια και απαιτείται για τη σύνθεση του DNA και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Biaglow JE and Miller RA, 2005).
- **Προστασία από το οξειδωτικό στρες και την απόπτωση (Εικόνα 10).** Η TRX1 δρα μαζί με το NADPH και την TRXR1 ως ένα αποτελεσματικό αναγωγικό σύστημα για τα πρωτεϊνικά δισουλφίδια που έχουν εκτεθεί και συνεργάζεται με οικογένειες TRX-εξαρτώμενων περοξυδασών (περοξυρεδοξίνες) για να απομακρύνει το ενδοκυττάριο υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στο DNA ρυθμίζεται θετικά από την TRX1 και τον παράγοντα-1 οξειδοαναγωγής (REF-1). Επίσης, η TRX1 εκδηλώνει το ρόλο της μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες που την προσδέουν. Η TBP-2 (πρωτεΐνη που προσδένει στην TRX)/VDUP1 (πρωτεΐνη που αυξάνεται από τη βιταμίνη D3) πρωτεΐνη διαδραματίζει έναν ουσιώδη ρόλο στον αναπτυξιακό έλεγχο. Τέλος, όταν η TRX1 οξειδώνεται λόγω του οξειδωτικού στρες, η κινάση1 που ρυθμίζει τη σηματοδότηση της απόπτωσης (ASK1) απελευθερώνεται από την οξειδωμένη TRX1, ενεργοποιείται και επάγει ένα αποπτωτικό σήμα (Masutani H et al., 2005).
- **Ρύθμιση οξειδοαναγωγικά ευαίσθητων σηματοδοτικών μονοπατιών.** Πρόσφατα, δείχτηκε ότι τα κανάλια καλίου της κυτταρικής μεμβράνης (το  $Kv4 K(+)$  κανάλι) μπορούν να ρυθμίζονται οξειδοαναγωγικά από το σύστημα της TRX1. Επίσης, η απενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης που εξαρτάται από το κυκλικό AMP (PKA) κατά τη σηματοδότηση από την ινσουλίνη μπορεί να αντιστραφεί από τις TRX1 και TRXR1. Παράλληλα, το ομόλογο της Φωσφατάσης και της Τενσίνης (PTEN) αποτελεί αναστολέα των όγκων και σημαντικό ρυθμιστή της κυτταρικής μετανάστευσης ή επιβίωσης μέσω αναπτυξιακών παραγόντων ή ιντεγκρινών. Το μόριο αυτό μπορεί εύκολα να απενεργοποιηθεί μέσω οξείδωσης από  $H_2O_2$  και φαίνεται ότι το σύστημα της

θειορεδοξίνης είναι το προτιμώμενο αναγωγικό σύστημα για την επανενεργοποίησή του. Τέλος, και η PTP (tyrosine phosphatase, φωσφατάση πρωτεϊνικής τυροσίνης) μπορεί να προστατευθεί από την οξείδωση ή να επανακτήσει την ενεργότητά της μετά από μία «οξειδωτική έκρηξη» με τη βοήθεια του εν λόγω συστήματος (Arner ES, 2009).



Εικόνα 10: Ο ρόλος του συστήματος της θειορεδοξίνης και των σχετιζόμενων μορίων στη ρύθμιση της απόπτωσης (Masutani H et al., 2005).

- **Ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων.** Η TRX1 έχει την ικανότητα να τροποποιεί τη δυνατότητα πρόσδεσης στο DNA διάφορων οξειδοαναγωγικά-ευαίσθητων μεταγραφικών παραγόντων, όπως των NF-κB, AP-1, HIF-1 και p53 (Hirota K et al., 1997; Hirota K et al., 1999; Moos PJ et al., 2003). Συγκεκριμένα για το HIF-1 έχει βρεθεί ότι κάτω από φυσιολογικές ή υποξικές συνθήκες, η υπερέκφραση της TRX1 αυξάνει την έκφραση και την ενεργότητα πρόσδεσης στο DNA του HIF-1α μέσω του REF-1. Η αυξημένη έκφραση των TRX1 και REF-1 αύξησε ακόμα περισσότερο αυτή την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, υποδεικνύοντας μία οξειδοαναγωγικά εξαρτώμενη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση του HIF-1α (Ema M et al., 1999; Welsh SJ et al., 2002).
- **NO-σηματοδότηση.** Εμπλέκεται στη σηματοδότηση που μεσολαβείται από το NO, τόσο έμμεσα λόγω της οξειδοαναγωγικής ρύθμισης των NOS (nitric oxide synthase, συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου) ισοενζύμων, όσο και άμεσα, αφού η TRX1 νιτροσυλιώνεται στη δομική κυστεΐνη 69 που είναι απαραίτητη για την οξειδοαναγωγική της ενεργότητα και την αντι-αποπτωτική της δράση (Haendeler et al., 2002).
- **Υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών και οιστρογόνων.** Ένας άλλος ρόλος της TRX1 στη μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι η ικανότητά της να ρυθμίζει τις



ενεργότητες του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Grippe et al., 1985; Makino Y et al., 1996; Makino Y et al., 1999) και του υποδοχέα των οιστρογόνων (Hayashi S et al., 1997).

- **Δομή κυτταροσκελετού:** Είναι γνωστό ότι τα κύρια συστατικά του ευκαρυωτικού κυτταροσκελετού ρυθμίζονται οξειδοαναγωγικά από το κυτταροπλασματικό TRX σύστημα. Η οξείδωση τόσο της μη-μυϊκής όσο και της μυϊκής β- και γ-ακτίνης αναστέλλει τον πολυμερισμό της ακτίνης και αυτό το φαινόμενο αντιστρέφεται από το σύστημα της TRX1. Από την άλλη, ο πολυμερισμός της τουμπουλίνης μπορεί να ανασταλεί από την αναγωγή ενός δισουλφιδίου της τουμπουλίνης από το παραπάνω σύστημα (Arner ES, 2009).
- **Συμμετοχή στη φλεγμονώδη απόκριση.** Η εξωκυττάρια TRX1 φαίνεται να κατέχει συγκεκριμένο ρόλο στην ανάπτυξη της φλεγμονώδους απόκρισης. (Bertini R et al., 1999; Jikimoto T et al., 2002; Nakamura H et al., 2001b; Sumida Y et al., 2000; Yamada Y et al., 2003). Η TRX του πλάσματος αυξάνεται σε διάφορες ασθένειες, όπως στον HIV, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, στο άσθμα, στην ηπατίτιδα C και στη στεατοηπατίτιδα (Watson WH et al., 2004).
- **TRX1 και καρκίνος.** Πολλοί καρκίνοι στον άνθρωπο παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα TRX1, ενώ η κυτταρική αντίσταση στη χημειοθεραπεία φαίνεται να σχετίζεται με τη δράση της TRX1 σαν αυξητικού παράγοντα. Ωστόσο, η TRX1 αποτελεί έναν μη-τυπικό αυξητικό παράγοντα, καθώς δεν προσδέεται σε κάποιον ειδικό υποδοχέα. Επομένως, θα πρέπει να θεωρείται σημαντικός αυξητικός συμπαράγοντας. Οι μηχανισμοί πίσω από τις προ-αυξητικές δράσεις της TRX1 έχουν να κάνουν είτε με την ικανότητά της να αποτρέπει την απενεργοποίηση ή να ενισχύει πιο άμεσα τη λειτουργία άλλων ενδογενών αναπτυξιακών παραγόντων (Watson WH et al., 2004).
- **Συμμετοχή σε άλλες κλινικές καταστάσεις.** Η TRX προστατεύει τους φακούς από το οξειδωτικό στρες και το σχηματισμό καταρράκτη (Reddy PG et al., 1999). Επίσης, αναστέλλει τις αρρυθμίες που επάγονται από τον επανεμποτισμό σε μοντέλο καρδιάς αρουραίου αναδεικνύοντας έναν προστατευτικό ρόλο στην οξεία καρδιακή ισχαιμία (Aota M et al., 1996).

Ο μεγάλος αριθμός λειτουργιών που έχει αποδοθεί στην TRX1, υποδηλώνει ξεκάθαρα ότι αυτό το μόριο είναι απαραίτητο για την κυτταρική επιβίωση. Πράγματι, από το 1996 είναι γνωστό ότι το TRX1-/- ποντίκι πεθαίνει σε ένα πολύ πρόωρο στάδιο της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Matsui M et al., 1996).

**TRX2:** Η μιτοχονδριακή θειορεδοξίνη των θηλαστικών (TRX2) παρουσιάζει 35% ομολογία με την κυτταροπλασματική ισομορφή της, την TRX1, επιπλέον οι δύο πρωτεΐνες μοιράζονται πολυάριθμα συντηρημένα αμινοξέα, όπως την αλληλουχία του ενεργού κέντρου WCGPC. Εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, αλλά εμφανίζει τα υψηλότερα επίπεδα στους μεταβολικά ενεργούς, όπως στο στομάχι, τους όρχεις, το ήπαρ, τους νευρώνες, την καρδιά και το επινεφρίδιο. Μία από τις κύριες διαφορές με την TRX1 είναι η παρουσία μίας αμινοτερματικής επέκτασης 60 αμινοξέων στην TRX2. Αυτή η επέκταση περιέχει ένα χαρακτηριστικό σήμα εντοπισμού στα μιτοχόνδρια (MTS), το οποίο κατευθύνει την πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια. Διαίρεση σε μία συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης από μία μιτοχονδριακή πεπτιδάση δίνει την ώριμη πρωτεΐνη των 12,2 kDa (Damdimopoulos AE et al., 2002; Spyrou G et al., 1997).

- **Μιτοχονδριακή αντιοξειδωτική άμυνα.** Η TRX2 απομακρύνει τις ROS, είτε άμεσα ή μέσω των TRXR2 και PRXIII (περοξυρεδοξίνη III) (Miranda-Vizuete A et al., 2000).
- **Απόπτωση.** Κατά τη μείωση της έκφρασης της TRX2, το μιτοχονδριακό μεμβρανικό δυναμικό μειώνεται και αυξάνεται η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, οδηγώντας στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, στην ενεργοποίηση των κασπασών και στην εκτέλεση της απόπτωσης (Damdimoropoulos AE et al., 2002; Tanaka T et al., 2002). Φαίνεται πάντως ότι η ρύθμιση της απόπτωσης από την TRX2 λαμβάνει χώρα μέσω της ρύθμισης αναρροϊκών αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως της BCL-xL (Wang D et al., 2006). Επίσης, η TRX2 εμπλέκεται στην ASK-1- μεσολαβούμενη απόπτωση (Zhang R et al., 2004). Τα μιτοχόνδρια αποτελούν σημαντική πηγή ενδοκυττάρων ROS και η TRX2 κατέχει έναν σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των ROS στα μιτοχόνδρια. Το παραπάνω το επιτυγχάνει αποτρέποντας την απόπτωση που μεσολαβείται από τις ROS που παράγονται από διαρροή ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα ή από αναρροϊκά σηματοδοτικά μονοπάτια. Στην πραγματικότητα, έχει δείχθει ότι η TRX2 απομακρύνει εξειδικευμένα τις ROS που παράγονται από τη σηματοδότηση του TNFα και εμποδίζει την καταρροϊκή ενεργοποίηση του NF-κΒ και την απόπτωση (Hansen JM et al., 2006). Ακόμα, η TRX2 έχει αποδειχθεί ουσιώδης για την εμβρυογένεση, καθώς knock-out έμβρυα ποντικού αποπύπτουν μαζικά και πεθαίνουν περίπου όταν ωριμάζουν τα μιτοχόνδρια και ξεκινάει η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Επιπλέον, οι εμβρυονικοί ινοβλάστες που απομονώθηκαν από ομόζυγα TRX2-/- έμβρυα δεν ήταν βιώσιμοι (Nonn L et al., 2003).

#### 1.2.1.2 Αναγωγή της Θειορεδοξίνης (TRXR)

Οι αναγωγάσες των θειορεδοξινών ανήκουν στην οικογένεια των οξειδοαναγωγασών των δισουλφιδίων των νουκλεοτιδίων, η οποία συμπεριλαμβάνει την αναγωγή της γλουταθειόνης, την αφυδρογονάση των λιποαμιδίων και την αναγωγή του ιόντος του υδραργύρου (Gilbert HF, 1990). Τα ένζυμα αυτά καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο υπόστρωμα από το NADPH, μέσω του FAD και ενός N-τελικού δισουλφιδικού ενεργού κέντρου.

Είναι αξιοσημείωτο ότι στη φύση έχουν βρεθεί δύο κύριες μορφές TRXRs που αποτελούν δύο κατά κύριο λόγο διαφορετικές δομές ενζύμων που ανάγουν την TRX (**Πίνακας 3**).

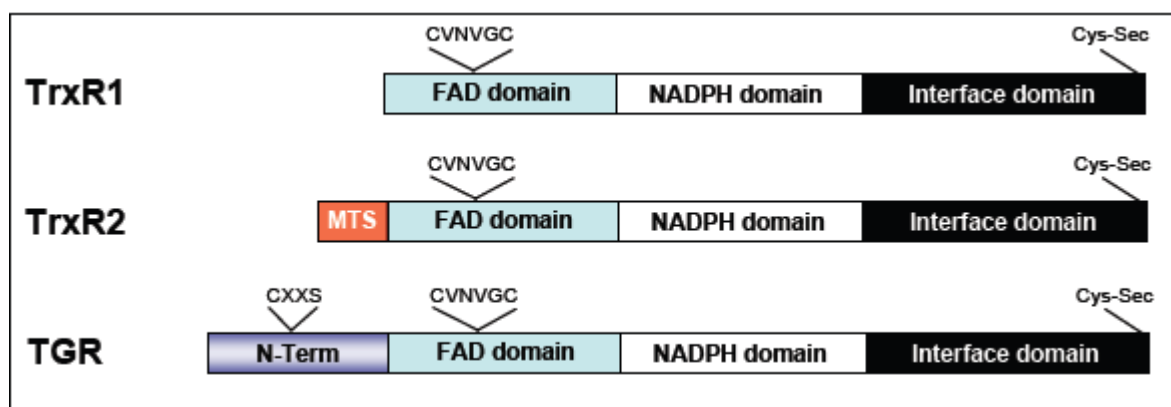
Τα βακτήρια, τα φυτά, τα αρχαία και οι περισσότεροι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν μία μικρότερη (μη-σεληνοπρωτεϊνική) μορφή της TRXR, ενώ τα ζώα έχουν μία μεγαλύτερη σεληνοπρωτεϊνική (Arner ES and Holmgren A, 2000; Gromer S et al., 2004; Lillig CH and Holmgren A, 2007; Williams CH et al., 2000). Το παραπάνω απεικονίζει μία συγκλίνουσα εξέλιξη της λειτουργίας αναγωγής της TRX από δύο δομικά διαφορετικούς πρωτεϊνικούς προγόνους, πέρα από τη συγκλίνουσα εξέλιξη που παρατηρείται για τη δράση οξειδοαναγωγής της βακτηριακού τύπου TRXR και της GR, με την τελευταία να είναι παρόμοια σε δομή και λειτουργία σε όλους τους οργανισμούς που διαθέτουν το ένζυμο (Kuriyan J et al., 1991). Η TRXR των θηλαστικών, εν αντιθέσει με το βακτηριακό τύπο του ενζύμου, είναι αρκετά όμοια με την GR όσον αφορά τη γενική δομή και λειτουργία, αλλά φέρει μία πρόσθετη C-τελική επιμήκυνση (περίπου 16 αμινοξέων) που περιέχει ένα ακόμα οξειδοαναγωγικά ενεργό μοτίβο. Στα θηλαστικά το μοτίβο αυτό έχει και μία σεληνοκυστεΐνη (Sec), το αμινοξύ που περιέχει σελήνιο (Arscott LD et al., 1997; Zhong L et al., 1998).



Πίνακας 3: Κύριες Μορφές TRXR (Koharyona M and Kolarova M, 2008)	
<b>Μορφή μεγάλου Μ.Β.</b>	<p>Υπομονάδα Μ.Β. περίπου 55 kDa (στον άνθρωπο και στο <i>Plasmodium falciparum</i>).</p> <p>Διμερείς πρωτεΐνες με ένα FAD, ένα οξειδοαναγωγικά ενεργό δισουλφίδιο και μία τρίτη οξειδοαναγωγικά ενεργή ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η τρίτη ομάδα είναι ένα σελυνυλο-σουλφίδιο στην ανθρώπινη TRXR και ένα δισουλφίδιο στο ένζυμο του <i>P. falciparum</i>.</p>
<b>Μορφή μικρού Μ.Β.</b>	<p>Υπομονάδα Μ.Β. περίπου 35 kDa (στην <i>E. coli</i> και σε άλλα προκαρυωτικά, στη ζύμη, στο μυκόπλασμα, στην <i>Giardia duodenalis</i>, στο <i>Arabidopsis thaliana</i> και στο <i>Methanococcus janaschii</i>)</p> <p>Διμερείς πρωτεΐνες με ένα FAD και ένα οξειδοαναγωγικά ενεργό δισουλφίδιο σε κάθε υπομονάδα.</p>

#### 1.2.1.2.1 Αναγωγάσες των Θειορεδοξινών των Θηλαστικών

Τρεις ισομορφές της TRXR έχουν βρεθεί και χαρακτηριστεί στα θηλαστικά (**Εικόνα 11**): η κυτταροπλασματική (TRXR1), η μιτοχονδριακή (TRXR2) και η TRXR που καταλύει την αναγωγή τόσο της TRX όσο και του GSSG, αποκαλείται αναγωγάση θειορεδοξίνης γλουταθειόνης (TGR) και βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στους όρχεις (Miranda-Vizuete A et al., 1999; Sun QA et al., 2001; Sun QA et al., 1999). Και οι τρεις ισομορφές περιέχουν τις ίδιες δομικές περιοχές και χαρακτηρίζονται από την παρουσία Sec στο C-τελικό ενεργό κέντρο (Gly-Cys-Sec-Gly-COOH), η οποία κωδικοποιείται από ένα κωδικόνιο UGA παρουσία ενός 3'-UTR SECIS στοιχείου. Το ενεργό κέντρο (CVNVGC) είναι συντηρημένο μεταξύ των TRXRs και GRs.

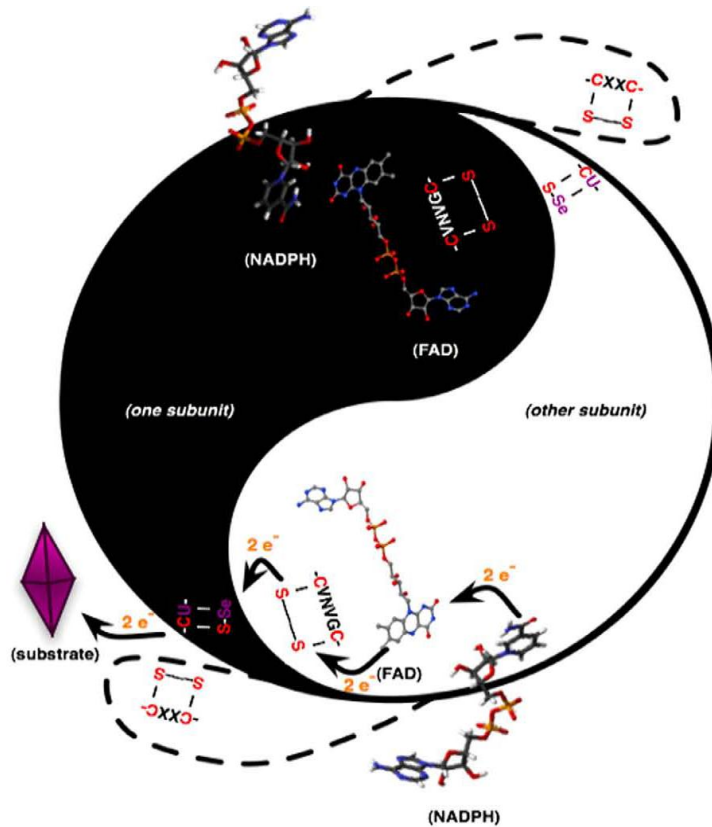


Εικόνα 11. Ισομορφές των TRXRs των θηλαστικών

Η Sec αποτελεί ανάλογο της κυστεΐνης το οποίο αντί για θείο διαθέτει σελήνιο και έχει βρεθεί σε 25 ανθρώπινες πρωτεΐνες (Kryukov GV et al., 2003). Αναφέρεται ως το 21ο αμινοξύ και προσφέρει μοναδικά χαρακτηριστικά στις σεληνοπρωτεΐνες λόγω των χημικών ιδιοτήτων του σεληνίου και της έμφυτης υψηλής δραστηριότητας και των οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων της Sec (Johansson L et al., 2005). Η παραγωγή σεληνοπρωτεϊνών περιλαμβάνει ενδογενείς μηχανισμούς για την εισαγωγή κατά τη μετάφραση της Sec στη θέση ενός προ-καθορισμένου κωδικονίου UGA, το οποίο φυσιολογικά οδηγεί σε λήξη της μετάφρασης στις μη-σεληνοπρωτεΐνες. Το UGA που κωδικοποιεί Sec καθορίζεται από μία ειδική δευτεροταγή δομή στο mRNA της σεληνοπρωτεΐνης, το στοιχείο SECIS (ακολουθία εισαγωγής σεληνοκυστεΐνης), το οποίο αλληλεπιδρά με έναν μεταφραστικό μηχανισμό αφιερωμένο στη σεληνοκυστεΐνη.

Ο καταλυτικός μηχανισμός της TRXR των θηλαστικών περιλαμβάνει την αναγωγή της TRXR με τη συμμετοχή NADPH (**Εικόνα 12**). Αρχικά, το ηλεκτρόνιο μετακινείται από το NADPH μέσω του FAD στο δισουλφίδιο του ενεργού κέντρου που σχηματίζεται από τις κυστεΐνες στις θέσεις 59 και 64 της N- τελικής περιοχής. Στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια από το τη σχηματισμένη διθειόλη της μίας υπομονάδας του διμερούς ενζύμου μετακινούνται στο σεληνυλο-σουλφίδιο της C-τελικής αλληλουχίας της άλλης υπομονάδας (Gallogly MM and Mieyal JJ, 2007; Sandalova T et al., 2001; Zhong L et al., 2000). Η ανηγμένη C-τελική Sec συμμετέχει στην αναγωγή πολλαπλών υποστρωμάτων της TRXR των θηλαστικών (Nordberg J and Arner ES, 2001). Η αντικατάσταση της Sec με μία κυστεΐνη καθιστά το ένζυμο ουσιαστικά ανενεργό (Zhong L et al., 2000).

**TRXR1:** Η κυτταροπλασματική αναγωγή της θειορεδοξίνης των θηλαστικών (TRXR1 ή TRXR1a) είναι η κλασική και πλέον καλά χαρακτηρισμένη μορφή TRXR. Εκφράζεται σε όλους τους ιστούς με τα υψηλότερα επίπεδα να εμφανίζονται στο ήπαρ και το νεφρό και τα χαμηλότερα στους όρχεις (Rundlof AK et al., 2000). Διάφορες λειτουργίες της TRXR1, ως μέλος του κυτταροπλασματικού συστήματος της θειορεδοξίνης έχουν αναφερθεί παραπάνω. Συνοπτικά, συμμετέχει στη σύνθεση των δεσοξυριβονουκλεοτιδίων, σε ευαίσθητα στην οξειδοαναγωγή σηματοδοτικά μονοπάτια (π.χ.: αντλίες καλίου και μονοπάτι ινσουλίνης), ενώ επηρεάζει και τη δομή του κυτταροσκελετού.



**Εικόνα 12: Ο καταλυτικός μηχανισμός της TrxR των θηλαστικών.**

Ανάλογα με το “Yin” και το “Yang”, οι δύο υπομονάδες διευθετούνται σε μία στερεοδομή κεφαλή-προς-ουρά με τις δύο υπομονάδες να απαιτούνται για έναν πλήρη καταλυτικό κύκλο κατά τη φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου. Λόγω αυτής της ομοδιμερούς διευθέτησης, κάθε ένζυμο διαθέτει δύο υπομονάδες. Το μονοπάτι των ηλεκτρονίων (βέλη) δείχνει μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADPH στο προσδεδμεμένο στο ένζυμο FAD, το οποίο ανάγει το δισουλφίδιο στο -CVNVGC- μοτίβο της N-τελικής περιοχής, που κατόπιν ανάγει το σεληνυλο-σουλφίδιο σε σεληνυλο-θειόλη στο C-τελικό -GCUG- μοτίβο της άλλης υπομονάδας, το οποίο περιέχει Sec. Η σεληνυλο-θειόλη αποτελεί το κατάλληλο ενεργό κέντρο που μπορεί να ανάγει πολλά από τα εν δυνάμει υποστρώματα του ενζύμου (απεικονίζονται με ένα μωβ διαμάντι; Αυτό μπορεί να είναι το δισουλφίδιο του ενεργού κέντρου της TRX, άλλα πρωτεϊνικά δισουλφίδια-υποστρώματα του ενζύμου, ένας αριθμός συστατικών που περιέχουν σελήνιο, περοξειδία ή δισουλφιδικά υποστρώματα, όπως το λιποϊκό οξύ) (Arner ES, 2009).

Περαιτέρω χαρακτηριστικά της TRXR1 και βιολογικές λειτουργίες που αξίζει να αναφερθούν περιγράφονται στη συνέχεια.

- **Ευρεία ειδικότητα υποστρώματος.** Εκτός από τις θειορεδοξίνες, μπορεί να ανάγει πρωτεΐνες όπως οι PDI και GPx3, καθώς και συστατικά μικρού μοριακού βάρους όπως το λιποϊκό οξύ, την ουβικινόνη, υδροπεροξειδία λιπιδίων και τη σεληνοκυστεΐνη (Nordberg J and Arner ES, 2001; Xia L et al., 2003). Ακόμα μπορεί να διασπάσει την S-νιτροσογλουταθειόνη (GSNO) σε γλουταθειόνη και NO (Nordberg J and Arner ES, 2001; Zhong L et al., 2000). Συνεπώς, η TRXR1 διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην

αντιοξειδωτική άμυνα, όχι μόνο άμεσα απομακρύνοντας τις ROS, αλλά και μέσω της αναγέννησης διαφορετικών αντιοξειδωτικών συστημάτων.

- **Απόπτωση.** Υπάρχουν αξιοσημείωτοι σύνδεσμοι μεταξύ των λειτουργιών της TRXR1 και της απόπτωσης. Αυτοί περιλαμβάνουν α) την επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης μετά τη στόχευση της TRXR1 με ηλεκτρόφιλα φάρμακα, β) τα αντι-αποπτωτικά χαρακτηριστικά του TRX συστήματος λόγω των εν γένει αντιοξειδωτικών του ιδιοτήτων, γ) την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 μέσω της TRX-καταλυόμενης απονιτροσυλίωσης κατά την ενεργοποίηση με τον Fas προσδέτη, δ) τα αντιαποπτωτικά χαρακτηριστικά αρκετών αντιοξειδωτικών σεληνοπρωτεϊνών, η σύνθεση των οποίων μπορεί εν μέρει να εξαρτάται από την αναγωγή του  $\text{SeO}_3^{2-}$  από την TRXR1, ε) τις αποπτωτικές ιδιότητες τοξικών συγκεντρώσεων  $\text{SeO}_3^{2-}$ , στ) την ωρίμανση του λειτουργικού p53 που εξαρτάται από την ενεργότητα της TRXR1, καθώς και πρόσθετες διασυνδέσεις μεταξύ της TRXR1 και της απόπτωσης που περιλαμβάνουν συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια.
- **Ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων.** Το συγκεκριμένο ένζυμο, όπως και η TRX εμπλέκεται στη ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι p53, HIF-1, AP-1 και NF-κB (Anestal K and Arner ES, 2003; Cassidy PB et al., 2006; Hu J et al., 2001; Karimpour S et al., 2002; Ma X et al., 2002; Ma X et al., 2001; Moos PJ et al., 2003; Sakurai A et al., 2004). Συγκεκριμένα για το HIF-1, η εξασθενημένη ενεργότητα της TRXR1 φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση του HIF-1α (Moos PJ et al., 2003).

Η αποσιώπηση του γονιδίου της TRXR1 σε μοντέλα ποντικού οδήγησε σε εμβρυϊκό θάνατο περίπου κατά την ένατη εμβρυϊκή ημέρα, με σημαντική αναπτυξιακή καθυστέρηση και έλλειψη σχηματισμού του πρώιμου μεσοδέρματος (Bondareva AA et al., 2007). Ωστόσο, το αξιοσημείωτο είναι ότι η καρδιακή ανάπτυξη δεν επηρεάστηκε από την εξαρτημένη καρδιο-ειδική αποσιώπηση του γονιδίου και τα καρδιομυοκύτταρα από τα TRXR1/- έμβρυα μπορούν να πολλαπλασιαστούν *in vitro*. Αυτό, όμως, δεν ισχύει και για τους ινοβλάστες των παραπάνω εμβρύων (Jakuroglu C et al., 2005).

**TRXR2:** Η μιτοχονδριακή αναγωγή της θειορεδοξίνης (TRXR2) παρουσιάζει 84% ομοιότητα σε πρωτεϊνικό επίπεδο με την Trxr1: διαθέτει περιοχές πρόσδεσης FAD και NADPH, ένα συντηρημένο CVNVGC ενεργό κέντρο και ένα προτελευταίο κατάλοιπο Sec, που της προσδίδουν παρόμοιες βιοχημικές ιδιότητες με την TRXR1. Μεταβαίνει στο μιτοχόνδριο μέσω μίας αλληλουχίας MTS. Η βιολογική δράση της TRXR2 είναι πολύ λιγότερο μελετημένη από της TRXR1.

- **Υποστρώματα.** Πέρα από την TRX2, η TRXR2 φαίνεται να ανάγει και μη-σχετικά συστατικά όπως τα 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) και  $\text{SeO}_3^{2-}$ .
- **Διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης των μιτοχονδρίων.** Συντελεί στην απομάκρυνση των ROS που δημιουργούνται στα μιτοχόνδρια, είτε άμεσα ή μέσω της αναγωγής της TRX2 η οποία με τη σειρά της ανάγει την PRXIII που μπορεί να απομακρύνει τις ROS (Miranda-Vizuete A et al., 2000). Στην ουσία, έχει αποδειχθεί ότι η ενεργότητα της PRXIII εξαρτάται άμεσα από εκείνη της TRXR2 (Kim JR et al., 2004). Η ενεργή TRXR2 συμμετέχει επίσης στην προστασία του κυττάρου από την απόπτωση διατηρώντας τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Bragadin M et al., 2004). Ακόμα, η TRXR2 αλληλεπιδρά άμεσα με το κυτόχρωμα c και διασώζει τα μιτοχόνδρια από δυσλειτουργίες του συμπλόκου III (Nalvarte I et al., 2004b), υποδηλώνοντας μία

σημαντική λειτουργία της TRXR2 στη διατήρηση λειτουργικής μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας. Ενδέχεται, επίσης, να συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Kim MR et al., 2003).

Σε έντονη αντίθεση με το φαινότυπο του TRXR1-/- ποντικού, η αποσιώπηση του γονιδίου της TRXR2 στον ποντικό κατέληξε σε εμβρυικό θάνατο κατά τη 13η εμβρυική ημέρα, με σοβαρή βλάβη στην αιμοποίηση, αυξημένη απόπτωση στο ήπαρ, ανεπαρκή καρδιακή ανάπτυξη και μειωμένο πολλαπλασιασμό των καρδιομυοκυττάρων, καθώς και αυξημένη ευαισθησία των εμβρυικά προερχόμενων TRXR2-/- στο οξειδωτικό στρες (Conrad M et al., 2004).

### 1.2.2 Το Σύστημα της Γλουταρεδοξίνης

Οι Γλουταρεδοξίνες (GRXs) περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1976 ως γλουταθειονο-εξαρτώμενες αναγωγάσες του δισουλφιδίου της RNR (ribonucleotide reductase, ριβονουκλεοτιδική αναγωγή), όταν η GRX κατάφερε να αποκαταστήσει την ανάπτυξη της *E. coli* σε μία μεταλλαγή έλλειψης της TRX1 (Holmgren A, 1976). Οι TRXs μοιράζονται έναν αριθμό κοινών λειτουργιών με τις GRXs, ωστόσο σύντομα έγινε προφανές ότι οι GRXs είναι πιο ευέλικτες από τις TRXs όσον αφορά την επιλογή του υποστρώματος και τους μηχανισμούς αντίδρασης. Επιπλέον, εκτός από τις GRXs με το χαρακτηριστικό μοτίβο στο ενεργό κέντρο CPYC, πρόσφατα ανακαλύφθηκε μία δεύτερη ομάδα GRXs. Η ομάδα αυτή, με ενεργό κέντρο μονοθειόλης, δε διαθέτει την C-τελική κυστεΐνη στο ενεργό κέντρο (CGFS), αλλά διαθέτει όλα τα δομικά και λειτουργικά στοιχεία για να προσδένει και να χρησιμοποιεί τη γλουταθειόνη (GSH) ως υπόστρωμα. Λόγω αυτών των ανακαλύψεων και της αυξανόμενης αναγνώρισης της σημασίας του οξειδοαναγωγικού ελέγχου στην κυτταρική λειτουργία, το πεδίο των GRXs εξελίσσεται και επεκτείνεται ακόμα (Gallogly MM et al., 2009).

Στο σύστημα της γλουταρεδοξίνης, ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADPH στην αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), στη συνέχεια στη γλουταθειόνη (GSH) και, τέλος, στη γλουταρεδοξίνη (Holmgren A and Eslund F, 1995). Όπως θα αναλυθεί διεξοδικότερα στη συνέχεια, το τριπεπτιδίο της γλουταθειόνης (γ-γλουταμυλ-κυστεΐνυλ-γλυκίνη) αποτελεί το κύριο βιολογικό συστατικόθειόλης και διαδραματίζει έναν διττό ρόλο ως ρυθμιστής της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου και της αντιοξειδωτικής άμυνας (Meister A, 1994).

#### Καταλυτικός μηχανισμός της Γλουταρεδοξίνης

Σε αντίθεση με τις θειορεδοξίνες που παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή ομολογία, οι γλουταρεδοξίνες εμφανίζουν μάλλον υψηλή ομολογία ακολουθίας αμινοξέων, ιδίως στην περιοχή του ενεργού κέντρου. Δομικές μελέτες αποκάλυψαν τρεις χαρακτηριστικές περιοχές εντός των διθειολών GRXs. Πρώτο είναι το μοτίβο του ενεργού κέντρου CXXC (CPYC συνήθως), δεύτερη μία προσβάσιμη στο διαλύτη υδρόφοβη περιοχή και, τέλος, μία καλά καθορισμένη θέση πρόσδεσης για GSH. Η τελευταία περιλαμβάνει δύο διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου κορμού-κορμού που σχηματίζουν μία αντιπαράλληλη διαμοριακή β-γέφυρα μεταξύ της πρωτεΐνης και της GSH (Bushweller JH et al., 1994; Nordstrand K et al., 1999). Επιπλέον, οι τοπικές αλληλεπιδράσεις και οι μικρές, αλλά σημαντικές, αλλαγές στερεοδιάταξης στο ενεργό κέντρο ρυθμίζουν το δυναμικό οξειδοαναγωγής επηρεάζοντας τη σταθερότητα καθενός δισουλφιδικού τύπου (ανηγμένου, οξειδωμένου και μικτού) (Nordstrand, 2000). Σύγκριση μεταξύ της ανηγμένης και της οξειδωμένης μορφής της GRX1 της *E. coli* αποκάλυψε ότι η προσοχή στο διαλύτη



Στη διθειολική αναγωγή (**Εικόνα 13A**) συμμετέχουν και οι δύο κυστεΐνες του ενεργού κέντρου και παράγεται οξειδωμένη GRX (GRX-S<sub>2</sub>) και ανηγμένος στόχος [Prot-(SH)<sub>2</sub>]. Συγκριτικά, οι δομικά και λειτουργικά σχετιζόμενες TRXs ανάγουν ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνικών δισουλφιδίων, χρησιμοποιώντας το μηχανισμό αυτόν (Pan JL and Bardwell JCA, 2006). Στο μηχανισμό μονοθειόλης (**Εικόνα 13B**) που αφορά την αναγωγή μικτών δισουλφιδίων πρωτεΐνης-SG, οι GRXs χρησιμοποιούν μόνο την N-τελική κυστεϊνική θειόλη (Bushweller JH et al., 1992). Δεδομένου ότι η αναγωγή των γλουταθειονυλιωμένων πρωτεϊνών φαίνεται να απαιτεί την αναγνώριση μόνο του GSH τμήματος του υποστρώματος και όχι του ίδιου του υποστρώματος, ο μηχανισμός μονοθειόλης που οδηγεί σε απογλουταθειονυλίωση μπορεί να θεωρηθεί ως μια γενικότερη λειτουργία των GRXs (Bushweller JH et al., 1994; Nordstrand K et al., 1999). Τέλος, ο μηχανισμός αυτός είναι ειδικός για τις GRXs, αφού οι TRXs έχουν μικρή έως καθόλου ενεργότητα αναγωγής μικτών δισουλφιδίων.

### 1.2.2.1 Γλουταρεδοξίνες των Θηλαστικών

Στα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, έχουν βρεθεί οι GRX1, GRX2, GRX3 (PICOT/TXNL-2) και GRX5. (**Εικόνα 14**).

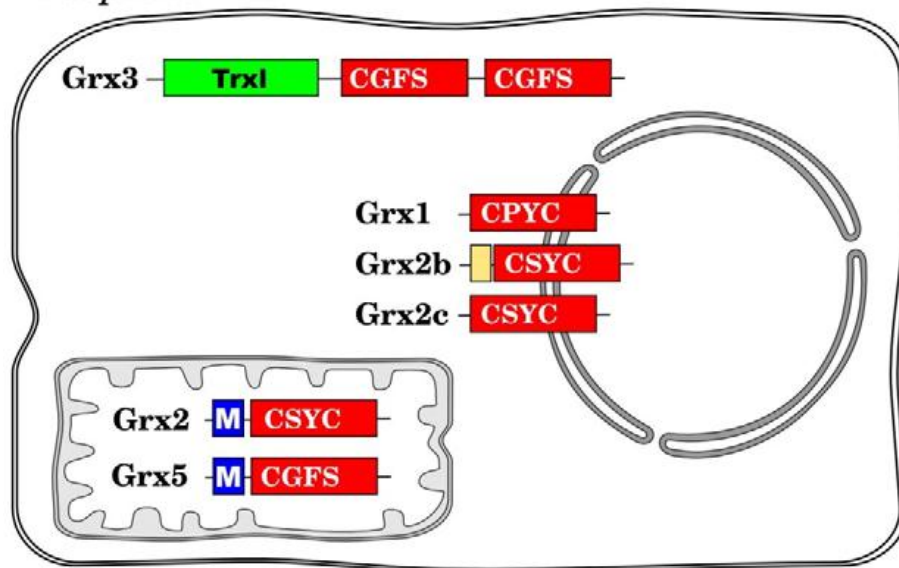
#### 1.2.2.1.1 Η Κυτταροπλασματική Γλουταρεδοξίνη των Θηλαστικών (GRX1)

Η ανθρώπινη GRX1 είναι μία πρωτεΐνη M.B. περίπου 12 kDa που κωδικοποιείται από το GLRX1 γονίδιο το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5. Πρόκειται για κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, αν και έχει εντοπιστεί και στον πυρήνα (Lysell J et al., 2003). Σε σύγκριση με την TRX, της οποίας τα επίπεδα (10 μM) κανονικά υπερβαίνουν τα επίπεδα της GRX1 στο κύτταρο (1 μM), η GRX1 έχει δέκα φορές χαμηλότερη τιμή  $K_m$  για τη ριβονουκλεοσιδική αναγωγή (Holmgren A, 1979; Holmgren A et al., 1978).

Η κυτταροπλασματική διθειολική GRX1 αποτελεί λειτουργικό ομόλογο της GRX1 της *E.coli* και της ζύμης. Η κυρίως μιτοχονδριακή GRX2 (GRX2a) περιέχει το ενεργό κέντρο CSYC. Αυτή η μικρή τροποποίηση (σερίνη αντί για προλίνη) καθιστά την πρωτεΐνη ικανή να δέχεται ηλεκτρόνια από την TRXR και να σχηματίζει σύμπλοκο με συστάδα σιδήρου-θείου (Lillig CH et al., 2008). Κύτταρα όρχεων και κάποια καρκινικά εκφράζουν δύο επιπρόσθετες κυτταροπλασματικές/πυρηνικές ισομορφές της πρωτεΐνης (GRX2b και GRX2c), οι οποίες προέρχονται από εναλλακτική έναρξη της μεταγραφής και μάτισμα. Η GRX3 (PICOT/TXNL-2) είναι μονοθειολική, έχει πολλές περιοχές GRX και αποτελεί ομόλογο των GRX3 και 4 της ζύμης. Η μιτοχονδριακή GRX5 είναι υψηλά συντηρημένη στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Lillig CH et al., 2008).

Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με την GRX1.



*H. sapiens*

**Εικόνα 14:** Ενδοκυττάρια κατανομή και δομή περιοχών των GRXs στο *H. sapiens*.

Η περιοχή της GRX απεικονίζεται με κόκκινο συμπεριλαμβανομένης της αλληλουχίας του ενεργού κέντρου. M: Σινιάλο Εντοπισμού στα Μιτοχόνδρια (Lillig CH et al., 2008).

Η GRX1 ανάγει δισουλφίδια μέσω του μηχανισμού διθειόλης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανταλλαγή θειολ-δισουλφιδίων (Holmgren A, 1989). Οι κύριες λειτουργίες της, καθώς και η συσχέτισή της με συγκεκριμένες ασθένειες περιγράφονται στη συνέχεια:

- **Αναγωγή πρωτεϊνικών δισουλφιδίων.** Για παράδειγμα συμμετέχει στην αναγωγή της RNR (Holmgren A, 1989) και του διϋδροασκορβικού (Wells WW et al., 1990).
- **Ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων.** Όπως αναλύεται στη συνέχεια, ο αντιστρεπτός σχηματισμός μικτών δισουλφιδίων ανάμεσα στις πρωτεϊνικές θειόλες και την GSH (η αποκαλούμενη γλουταθειονυλίωση) αποτελεί μηχανισμό-κλειδί στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση και σηματοδότηση. Οι GRXs καταλύουν την αναγωγή αυτών των μικτών δισουλφιδίων και ενδεχομένως και το σχηματισμό τους (Shelton MD et al., 2005).
- **Απόπτωση.** Όπως και η TRX1, έτσι και η GRX1 προσδένει στην ASK1 ανάλογα με την οξειδοαναγωγική της κατάσταση. Σε αυτό το σύμπλεγμα η ενεργότητα κινάσης της ASK1 καταστέλλεται. Η οξείδωση της GRX1 οδηγεί σε αποδέσμευση από το σύμπλοκο και ενεργοποίηση της ASK1 (Song JJ et al., 2002). Οπότε, η GRX1 μπορεί να ρυθμίζει την ενεργότητα κινάσης της ASK1 ανάλογα με την οξειδοαναγωγική κατάσταση της γλουταθειόνης (Song JJ and Lee YJ, 2003). Επίσης, η GRX1 προστατεύει τα κύτταρα από την επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου απόπτωση ρυθμίζοντας την οξειδοαναγωγική κατάσταση της πρωτεϊνικής κινάσης B (AKT) (Murata M et al., 2003; Wang J et al., 2007). Η GRX1 έχει ακόμα εμπλακεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 μέσω της αντιστρεπτής γλουταθειονυλίωσης της πρωτεΐνης (Pan S and Berk BC, 2007).
- **Καρκίνος.** Η GRX1 έχει συσχετιστεί με την υψηλή κακοήγη δυναμικότητα του ενδοκρινούς παγκρεατικού καρκινώματος και την καρκινογένεση βασικού κυττάρου. Το ενδοκρινές παγκρεατικό καρκίνωμα είναι ένας κακοήθης στερεός όγκος με μικρή δυνατότητα πρόγνωσης. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση από τους Nakamura και συν.



(Nakamura H et al.) αποκάλυψε αυξημένη έκφραση της GRX1 στις 29 από τις 32 περιπτώσεις σε σύγκριση με το παγκρεατικό κυσταδενοκαρκίνωμα ή το φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό. Το καρκίνωμα βασικού κυττάρου αποτελεί έναν από τους πλέον κοινούς όγκους ανάμεσα στον πληθυσμό των Καυκασίων. Σε μία διαλογή 588 γονιδίων μέσω διαφορικού υβριδισμού μίας ανθρώπινης cDNA συστοιχίας, παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης 10 γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της GRX1, σε 10 διαφορετικά δείγματα καρκινώματος βασικού κυττάρου και σε 2 λεπιδώδους σε σύγκριση με το φυσιολογικό δέρμα (Weiss T et al., 2003). Επίσης, η υπερέκφραση της GRX1 αυξάνει την αντοχή των MCF7 καρκινικών κυττάρων του μαστού στη δοξορουβισίνη, έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό παράγοντα (Meyer EB and Wells WW, 1999).

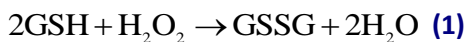
- **Αναπνευστικό σύστημα.** Κατά την εξέλιξη της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονικής νόσου (COPD), μειώνεται ο αριθμός των μακροφάγων που περιέχουν GRX1 σε σύγκριση με τις παραμέτρους του λειτουργικού πνεύμονα. Στην οξεία COPD ανιχνεύτηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα GRX1 στο πτύελο. Για αυτό, προτάθηκε ένας ρόλος για την GRX1 στην αναγωγή των εξωκυττάρων μικτών δισουλφιδίων με GSH κατά το οξειδωτικό στρες στην COPD (Peltoniemi MJ et al., 2006). Επιπρόσθετα, βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα GRX1 στα μακροφάγα των κυψελίδων ασθενών με σαρκοείδωση και αλλεργική φλεγμονή των κυψελίδων (Peltoniemi M et al., 2004). Η επίδραση της ενδογενούς ενεργοποίησης των επιπέδων έκφρασης της GRX1 στον πνεύμονα δεν είναι ξεκάθαρη. Σε μία πρώτη μελέτη μικροσυστοιχιών που συνέκρινε καπνιστές και μη, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα mRNA της GRX1 (Hackett NR et al., 2003), ωστόσο μία δεύτερη μελέτη ανέφερε 10πλάσια αύξηση στα επίπεδα αυτά 5-10 ώρες μετά την έκθεση στον καπνό του τσιγάρου (Yoneda K et al., 2003). Στις αλλεργικές ασθένειες του αναπνευστικού, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης της GRX1 (αλλά όχι και της GRX2), καθώς και μειωμένα επίπεδα των S-γλουταθειονυλιωμένων πρωτεϊνών (Reynaert NL et al., 2007).
- **Ισχαιμία/Επανεμποτισμός.** Η επαγωγή εγκεφαλικής ισχαιμίας στα τρωκτικά αποτελεί ένα κοινό μοντέλο της βλάβης μετά την ισχαιμία/επανεμποτισμό. Μετά την απόφραξη της μεσαίας εγκεφαλικής αρτηρίας μειώνεται η έκφραση της GRX1 σε περιοχές με βλάβη των νευρώνων (Takagi Y et al., 1999).
- **Νευροεκφυλισμός.** Στη νόσο του Alzheimer, η τοξικότητα του β-αμυλοειδούς ενδεχομένως να μεσολαβείται, τουλάχιστον εν μέρει από την οξείδωση της GRX1 και την επικείμενη επαγωγή της απόπτωσης, μέσω για παράδειγμα της ενεργοποίησης της ASK1 (Akterin S et al., 2006).  
Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι λόγω της τάσης της ντοπαμίνης να αυτό-οξειδώνεται και για αυτό παράγουν αυξημένα επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου. Φαίνεται ότι όταν προστεθεί στο μέσο ανθρώπινη GRX1, προστατεύει τους νευρώνες της κοκκιώδους στιβάδας της παρεγκεφαλίδας από ντοπαμινο-επαγόμενη απόπτωση ενεργοποιώντας τον NF-κΒ μέσω του REF-1 (Daily D et al., 2001) υποστηρίζοντας ενδεχομένως έναν προστατευτικό ρόλο της GRX1 στην ασθένεια του Parkinson.
- **Αναπαραγωγή.** Η GRX1 επάγεται κατά την εγκυμοσύνη (Sahlin L et al., 2000b) και μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση της τραχηλικής ωρίμανσης, ακολουθώντας κυρίως τη

χορήγηση προσταγλανδίνης E2. Επιπλέον, η έκφραση της GRX1 επηρεάζεται στον πλακούντα από εγκυμοσύνες με προ-εκλαμψία και/ή καθυστέρηση της ανάπτυξης των εμβρύων, ενώ η μείωση στην έκφρασή της σχετίζεται με τη σοβαρότητα της κατάστασης (Sahlin L et al., 2000a).

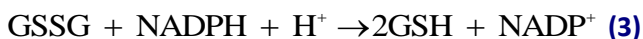
Η απενεργοποίηση του γονιδίου της GRX1 στον ποντικό δεν είχε καμία προφανή επίδραση στην ανάπτυξη υπό φυσιολογικές συνθήκες και οι knockout ποντικοί δεν ήταν πιο ευαίσθητοι στην καρδιακή υποξία (Ho YS et al., 2007) από τους αντίστοιχους αγρίου τύπου. Ο μοναδικός προφανής φαινότυπος ήταν η αυξημένη γλουταθειονυλίωση αρκετών πρωτεϊνών, ιδίως μετά τη χορήγηση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε επιλεγμένους ιστούς. Από την άλλη, η υπερέκφραση της GRX1 οδήγησε σε αυξημένη αντοχή των ποντικών στην καρδιακή ανοξία (Malik G et al., 2008).

### 1.2.2.2 Γλουταθειόνη: Από το οξειδωτικό στρες στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση

Η γλουταθειόνη (GSH), δηλαδή το τριπεπτίδιο γ-γλουταμυλ-κυστεϊνυλ-γλυκίνη, αποτελεί τη μη-πρωτεϊνική θειόλη που βρίσκεται στην υψηλότερη συγκέντρωση σχεδόν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και ένα από τα πλέον σημαντικά αντιοξειδωτικά στο κύτταρο (Fahey RC et al., 1977; Hwang C et al., 1992; Thornton JM, 1981). Ο αντιοξειδωτικός, προστατευτικός της ρόλος περιλαμβάνει την απομάκρυνση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και των λιπιδικών περοξειδίων μέσω της δράσης των GSH περοξειδασών (**Αντιδράσεις 1 και 2**), την ενζυμική πρόσδεση σε τοξικά εξωγενή ή ενδογενή ηλεκτρονιόφιλα που καταλύεται από τις GSTs, καθώς και τη μη-ενζυμική πρόσδεση σε κυτταροτοξικά μέταλλα (Torro S et al., 2008).



Σε αυτές τις αντιδράσεις παράγεται GSSG (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης) το οποίο μπορεί στη συνέχεια να αναχθεί σε GSH από την αναγωγή της γλουταθειόνης με κατανάλωση NADPH.



Η αναλογία GSH προς GSSG προσφέρει μία απλή και βολική έκφραση του κυτταρικού οξειδωτικού στρες (Schafer FQ and Buettner GR, 2001). Τυπικά, τα κύτταρα παρουσιάζουν μία υψηλή αναλογία GSH/GSSG και περισσότερο από το 90% της συνολικής γλουταθειόνης διατηρείται στην ανηγμένη μορφή μέσω κυτταροπλασματικής *de novo* σύνθεσης GSH, ενζυματικής αναγωγής του GSSG και πρόσληψης GSH (Meister A and Tate SS, 1976).

Ο βασικός ρόλος της GSH ως αντιοξειδωτικό αποδεικνύεται από την επιδείνωση της τοξικότητας διάφορων ενώσεων λόγω της εξάντλησης της GSH που επιτυγχάνεται με διάφορα μέσα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Κατά το παρελθόν, με λίγες εξαιρέσεις, η οξείδωση των πρωτεϊνικών κυστεϊνών από τις ROS περιλαμβανόταν στον τομέα της τοξικολογίας όπως και η έννοια του οξειδωτικού στρες στη συντριπτική πλειονότητα της επιστημονικής βιβλιογραφίας. Θεωρούμε ότι η έννοια της οξειδοαναγωγικής ρύθμισης εξελίχθηκε από εκείνη του οξειδωτικού στρες στις αρχές της δεκαετίας του '90, αφού πολλές έρευνες έδειξαν ότι οι ROS ή τα αντιοξειδωτικά ρυθμίζουν αντίθετα μεταγραφικούς παράγοντες, όπως τον NF-κB (Schreck R et al., 1991; Staal, 1990), καθώς και τη σηματοδότηση που μεσολαβείται από κυτοκίνες. Τα εν λόγω στοιχεία υποδεικνύουν ότι οι ROS δεν περιορίζονται απλώς στο να βλάπτουν μακρομόρια, είτε πρωτεΐνες

ή λιπίδια ή DNA, αλλά μπορούν πραγματικά να αλλάξουν τον κυτταρικό μεταβολισμό και τη γονιδιακή έκφραση.

Είναι σαφές ότι, από τις γνωστές πολλές μορφές της πρωτεϊνικής οξειδωσης (συμπεριλαμβανομένων της νίτρωσης και της καρβονυλίωσης), οι οξειδώσεις θειολών σε δισουλφίδια και S-νιτροσοθειόλες συνιστούν τους πλέον ενδιαφέροντες υποψηφίους για οξειδοαναγωγική ρύθμιση λόγω της αναστρεψιμότητάς τους (Ghezzi P, 2005).

### **Μηχανισμοί S-Γλουταθειονυλίωσης/ Απογλουταθειονυλίωσης**

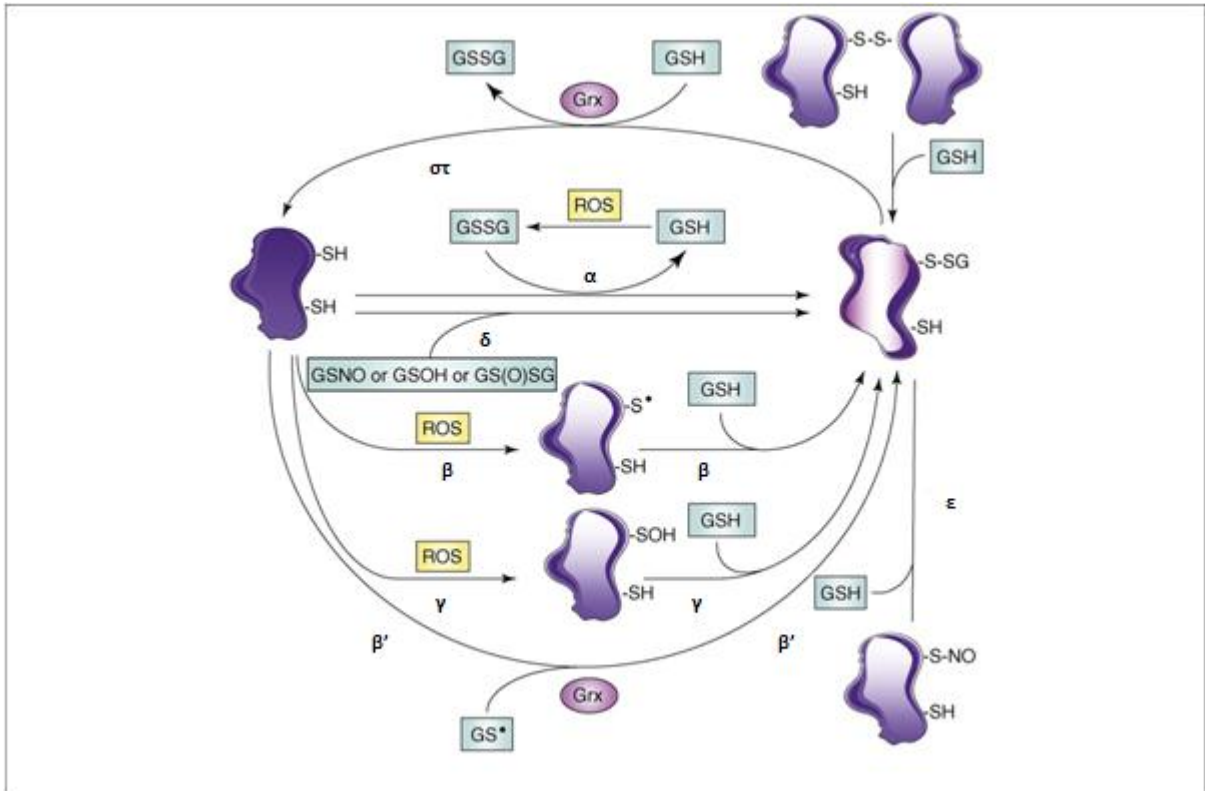
Ένα σημαντικό ποσοστό της γλουταθειόνης μπορεί να προσδεθεί αντιστρεπτά στη σουλφυδρική ομάδα (-SH) κάποιων πρωτεϊνικών καταλοίπων κυστεΐνης (PSH) μέσω ενός μηχανισμού που καλείται S-γλουταθειονυλίωση και ο οποίος οδηγεί σε S-γλουταθειονυλιωμένες πρωτεΐνες (PSSGs). Η S-Γλουταθειονυλίωση, έχει λάβει ιδιαίτερη προσοχή τα τελευταία χρόνια λόγω της οξειδοαναγωγικής ρύθμισης, ωστόσο δεν αποτελεί πρόσφατη ανακάλυψη. Οι πρωτοποριακές εργασίες των Brigelius και συν. (Brigelius R et al., 1982; Brigelius R et al., 1983) είχαν αποκαλύψει ότι στο φυσιολογικό ήπαρ, περίπου το 1% της συνολικής γλουταθειόνης βρίσκεται σταθερά σε μικτά δισουλφίδια με πρωτεΐνες (της τάξης των 30nmol/g). Ανάλογα με την κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση, το ποσό των εν λόγω μικτών δισουλφιδίων μπορεί να αυξηθεί μέχρι και σε 20-50% της συνολικής περιεκτικότητας σε γλουταθειόνη (Gilbert HF, 1984).

Αν και η S-γλουταθειονυλίωση υπό οξειδωτικό στρες είναι μία διαδεδομένη πρωτεϊνική τροποποίηση, οι μηχανισμοί του σχηματισμού πρωτεΐνης-SSG δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί. Στον **Πίνακα 4** και στην **Εικόνα 15** καταγράφονται πιθανοί μηχανισμοί σχηματισμού πρωτεΐνης-SSG που μπορεί να λαμβάνουν χώρα αυθόρμητα ή να καταλύονται από ένζυμα που δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί.

Η μεταβίβαση του γλουταθειονυλο-τμήματος του GSSG για να σχηματίσει πρωτεΐνη-SSG (**Πίνακας 4, Αντίδραση 1 και Εικόνα 15α**), δεν ευνοείται θερμοδυναμικά λόγω της υψηλής αναλογίας GSH / GSSG στα κύτταρα (Gilbert HF, 1995). Πράγματι, όπως αναφέρεται και στη συνέχεια (**Πίνακας 6, κριτήριο 3**), είναι απίθανο μικρές αλλαγές στην ενδοκυττάρια αναλογία GSH/GSSG να οδηγήσουν σε ουσιώδη γλουταθειονυλίωση πρωτεϊνών μέσω ανταλλαγής θειόλης-δισουλφιδίου μεταξύ του GSSG και των πρωτεϊνικών θειολών, αφού τα οξειδοαναγωγικά δυναμικά των περισσότερων κυστεϊνικών καταλοίπων είναι τέτοια που θα γλουταθειονυλιώνονταν κατά 50% μόνο σε μία πολύ μικρή αναλογία GSH/GSSG της τάξης του 1 (δηλαδή σε μία σχεδόν απίθανη αλλαγή στην κυτταρική συγκέντρωση GSSG). Επιπλέον, η εξαγωγή του GSSG από τα περισσότερα κύτταρα ως προστατευτικός μηχανισμός ενάντια στο οξειδωτικό στρες μειώνει δραστικά μεγάλες αλλαγές στο ενδοκυττάριο οξειδοαναγωγικό δυναμικό υπό φυσιολογικές καταστάσεις. Για αυτό, εάν και η ανταλλαγή θειόλης-δισουλφιδίου θα μπορούσε να οδηγήσει στην παραγωγή PSSGs κάτω από ακραίες συνθήκες (δηλαδή υψηλή συγκέντρωση GSSG), είναι ένας μη-πίθανος μηχανισμός *in vivo*. Στην πραγματικότητα, η S-γλουταθειονυλίωση μπορεί να λάβει χώρα σε άθικτα κύτταρα σε ποικίλα πειραματικά μοντέλα παραγωγής ROS χωρίς ανιχνεύσιμες αλλαγές στην αναλογία GSH/GSSG (Dalle-Donne I et al., 2009).

Πίνακας 4. Πιθανοί μηχανισμοί S-γλουταθειονυλίωσης πρωτεϊνών.	
Σχηματισμός μέσω ανταλλαγής θειόλης-δισουλφιδίου με το GSSG (Gilbert HF, 1984)	(1) $PSH + GSSG \rightarrow PSSG + GSH$
Σχηματισμός μέσω άμεσης οξειδωσης (Kosower NS and Kosower EM, 1987)	(2) $GSH + PSH \rightarrow PSSG$
Σχηματισμός μέσω ριζών θείου (Starke DW et al., 2003)	(3α) $PSH + HO\cdot \rightarrow PS\cdot + H_2O$ (3β) $GSH + HO\cdot \rightarrow GS\cdot + H_2O$ (4α) $PS\cdot + GSH \rightarrow PSSG + H\cdot$ (4β) $PSH + GS\cdot \rightarrow PSSG + H\cdot$
Σχηματισμός μέσω ενδιάμεσων σουλφενικών οξέων (Barrett WC et al., 1999; Forman, 2003)	(5α) $PSH + H_2O_2 \rightarrow PSOH + H_2O$ ή (5β) $PSH + ONOO\cdot \rightarrow PSOH + NO_2\cdot$ (6) $PSOH + GSH \rightarrow PSSG + H_2O$
Σχηματισμός μέσω S-νιτροσοθειολών (Ghezzi P, 2005)	(7) $GS^- + NO^+ \rightarrow [GSNO]$ (8α) $PSNO + GSH \rightarrow PSSG + HNO$ ή (8β) $PSH + GSNO \rightarrow PSSG + HNO$

Οι PSSGs μπορούν επίσης να σχηματιστούν μετά την εν μέρει «ενεργοποίηση» (για παράδειγμα μέσω οξειδωσης ενός ηλεκτρονίου) της πρωτεϊνικής θειόλης (PSH) ή της θειόλης του GSH στις αντίστοιχες θειωλ-ρίζες ( $PS\cdot$  ή  $GS\cdot$ ), οι οποίες εν συνεχεία αντιδρούν με GSH ή PSH, αντίστοιχα, για να δώσουν μία γλουταθειονυλιωμένη πρωτεΐνη (**Πίνακας 4, Αντιδράσεις 3, 4 και Εικόνα 15β**) (Dalle-Donne I et al., 2009). Είναι γνωστή η ικανότητα των  $GS\cdot$  ριζών να σταθεροποιούνται μέσω του σχηματισμού δισουλφιδικών ανιονικών ριζών (Wardman P and von Sonntag C, 1995), οπότε και η GRX ενδεχομένως να μπορεί να αντιδράσει κατά προτίμηση με την  $GS\cdot$  για να σχηματίσει μια GRX-SS-γλουταθειόνη δισουλφιδική ανιονική ρίζα ( $GRX-SSG^{\cdot-}$ ). Η αντίληψη αυτή βασίζεται στο ασυνήθιστα χαμηλό pKa (3,5) της κυστεΐνης του ενεργού κέντρου της GRX (Mieyal JJ et al., 1991b; Srinivasan U et al., 1997) και στην επιλεκτική σταθεροποίηση του γλουταθειονυλο-τμήματος στο GRX-SSG καταλυτικό ενδιάμεσο (Gravina S and Mieyal J, 1993; Mieyal JJ et al., 1995; Yang Y et al., 1998). Το ενδιάμεσο θα μπορούσε να διευκολύνει τη μεταφορά της GS ρίζας για να σχηματίσει είτε GSSG ή πρωτεΐνη-SSG. Πράγματι, η GRX επιταχύνει την S-γλουταθειονυλίωση διάφορων πρωτεϊνών-μοντέλων (GAPDH, PTP1B και ακτίνης) παρουσία ενός συστήματος παραγωγής GS ριζών (Starke DW et al., 2003). Εάν η GRX ή κάποιο άλλο ένζυμο είναι πιο σημαντικό για την κατάλυση του σχηματισμού πρωτεϊνών-SSG στα κύτταρα παραμένει να διευκρινιστεί. Πράγματι, η ταυτοποίηση ενζύμων που να είναι υπεύθυνα για την κατάλυση ενδοκυττάριου σχηματισμού συγκεκριμένων ενδιάμεσων πρωτεΐνης-SSG αποτελεί ένα από τα σύνορα για το χαρακτηρισμό οξειδαναγωγικών μηχανισμών σηματοδότησης.



**Εικόνα 15: Κύριοι μηχανισμοί πρωτεϊνικής S-γλουταθειονυλίωσης και απογλουταθειονυλίωσης. (α)** Το GSSG μπορεί να είναι αρκετό για να εκκινήσει την πρωτεϊνική γλουταθειονυλίωση (Πίνακας 4, Αντίδραση 1) ως απόκριση σε δραστικές αλλαγές στην αναλογία GSH/GSSG (π.χ. υπό συνθήκες σοβαρού οξειδωτικού στρες), ενώ η ROS-καταλυόμενη δημιουργία (β) πρωτεϊνικών ριζών θείου (Πίνακας 4, Αντιδράσεις 3 και 4) ή (γ) ενδιάμεσων σουλφενικού οξέως (Πίνακας 4, Αντιδράσεις 5 και 6) μπορεί να καταστήσει εφικτή την S-γλουταθειονυλίωση απουσία συσσώρευσης GSSG. Αντιδράσεις ανταλλαγής θειόλης-δισουλφιδίου μπορούν ακόμα να λάβουν χώρα ανάμεσα σε μία ανηγμένη πρωτεϊνική θειόλη και μία γλουταθειονυλιωμένη πρωτεΐνη (PSSG). Επιπρόσθετα, μία PSSG μπορεί να προκύψει από (δ) αντιδράσεις ανάμεσα σε κυστεϊνικές θειόλες πρωτεϊνών και S-νιτροσοθειόλες, όπως η GSNO ή άλλες οξειδωμένες μορφές της GSH όπως το σουλφενικό οξύ της γλουταθειόνης (GSOH) ή το S-μονοξειδίο του δισουλφιδίου της γλουταθειόνης [GS(O)SG] ή (ε) από αντιδράσεις μεταξύ της GSH και S-νιτροσυλιωμένων πρωτεϊνών (PSNO) (Πίνακας 4, Αντιδράσεις 7 και 8). Όποια και αν είναι η διαδρομή της S-γλουταθειονυλίωσης, η διαδικασία μπορεί να αντιστραφεί μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από τις οξειδοαναγωγάσες θειόλης-δισουλφιδίου GRXs (στ) (Dalle-Donne I et al., 2009).

Το πιο πιθανό είναι η S-γλουταθειονυλίωση να λαμβάνει χώρα μέσω της οξείδωσης δύο ηλεκτρονίων της PSH στο παράγωγο σουλφενικού οξέως (PSOH), το οποίο κατόπιν αντιδρά με την GSH (Πίνακας 4, Αντιδράσεις 5 και 6, Εικόνα 15γ) (Barrett WC et al., 1999; Forman, 2003). Βιοχημικές και κυτταρικές μελέτες υποστηρίζουν τον πιθανό ρόλο της GSNO στην προώθηση της πρωτεϊνικής S-γλουταθειονυλίωσης. Ωστόσο, δεν είναι εντελώς ξεκάθαρες οι πρωτεϊνικές ιδιότητες ή συνθήκες που ευνοούν τη δημιουργία PSNO ή PSSG κατά την αντίδραση PSH με

GSNO και υπάρχουν και λίγες πληροφορίες σχετικά με την ενελλακτική αντίδραση PSNO με GSH για να δώσει PSSG (**Πίνακας 4, Αντιδράσεις 7, 8 και Εικόνα 15 δ, ε**) (Ghezzi P, 2005).

Η άλλη πλευρά του νομίσματος είναι πόσο αναστρέψιμη είναι η διαδικασία, καθώς αυτό ακριβώς το χαρακτηριστικό είναι το κύριο που καθιστά τη γλουταθειονυλίωση πιθανό ρυθμιστικό μηχανισμό. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες από τις μελέτες σχετικά με την απογλουταθειονυλίωση δίνουν περισσότερη έμφαση στις δράσεις της γλουταθειονυλίωσης που σχετίζονται με την πρόκληση βλάβης και με την ενζυμική αδρανοποίηση λόγω του οξειδωτικού στρες και όχι στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση. Για αυτό, άλλωστε χρησιμοποιούν και τον όρο πρωτεϊνική αναγέννηση για την απογλουταθειονυλίωση. Σαφώς, τα μικτά δισουλφίδια είναι ασαφή και αναστρέψιμα με τη δράση άλλων θειολών σύμφωνα με τη γενική αντίδραση της ανταλλαγής θειόλης-δισουλφιδίου που φαίνεται παραπάνω (Πίνακας 5, Αντίδραση 1). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η διαδικασία της απογλουταθειονυλίωσης καταλύεται, κυρίως, από τις γλουταρεδοξίνες (Holmgren A, 1985; Holmgren A, 1989; Holmgren A and Eslund F, 1995). Ωστόσο, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 5**, είναι πιθανό να συνεισφέρουν και άλλα ένζυμα στην απογλουταθειονυλίωση.

<b>Πίνακας 5: Υποψήφια ένζυμα για την κατάλυση της αντιστρεπτής πρωτεϊνικής γλουταθειονυλίωσης (Gallogly MM and Mielal JJ, 2007).</b>		
<b>Ένζυμο</b>	<b>Τυπική αντίδραση που καταλύει</b>	<b>Προτεινόμενος ρόλος στην αντιστρεπτή γλουταθειονυλίωση</b>
<b>GRX5</b>	Δεν είναι γνωστό	Απογλουταθειονυλίωση (μη-ξεκάθαρος μηχανισμός)
<b>SRX</b> (Sulfiredoxin, σουλφιρεδοξίνη)	$PRX-SO_2H + ATP + 2RSH \rightarrow$ $PRX-SH + ADP + R-SS-R + H_2O$	Απογλουταθειονυλίωση (μη-ξεκάθαρος μηχανισμός)

Δεν είναι γνωστή η σχετική σημασία της καταλυόμενης από την GRX απογλουταθειονυλίωσης σε σχέση με εκείνη μέσω ανταλλαγής θειόλης-δισουλφιδίου. Ωστόσο, σε μία εργασία που χρησιμοποίησαν παρεμβόλιμο RNA (RNAi) για να απενεργοποιήσουν την ενδογενή GRX σε 3T3 ινοβλάστες διαπιστώθηκε ο ρόλος-κλειδί του ενζύμου αυτού στην κατάλυση της απογλουταθειονυλίωσης της ακτίνης και την επακόλουθη ρύθμιση του πολυμερισμού και της αναδιοργάνωσής της (Wang, 2003). *In vitro* μελέτες με γλουταθειονυλιωμένη αιμοσφαιρίνη έδειξαν ότι η GRX είναι πάνω από 1000 φορές πιο αποτελεσματική από τη διθειοθρεϊτόλη στην κατάλυση της απογλουταθειονυλίωσης και ότι η GSH (ακόμα και παρουσία συστήματος αναγέννησης της GSH χρησιμοποιώντας αναγωγάση του GSSG) δεν ήταν ικανή να διεκπεραιώσει την απογλουταθειονυλίωση απουσία της GRX (Mannervik, 1983; Mielal JJ et al., 1991a). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν και η GRX αναγεννά τις απενεργοποιημένες από το σχηματισμό μικτών δισουλφιδίων πρωτεΐνες πιο αποτελεσματικά από την TRX και η TRX μπορεί να απογλουταθειονυλιώσει γλουταθειονυλιωμένες πρωτεΐνες (Thomas JA et al., 1995). Η TRX ακόμα

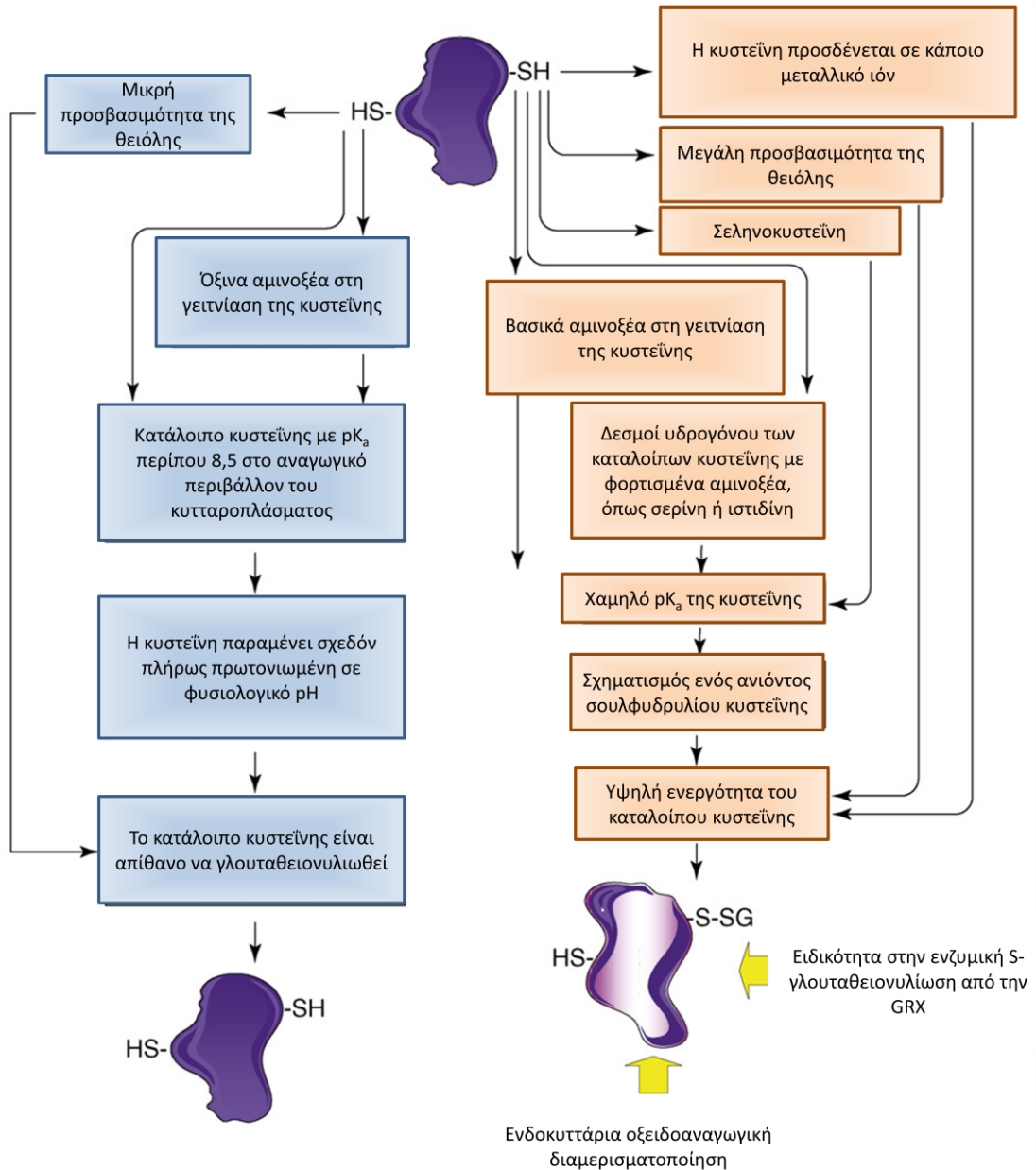
αναγεννά αποτελεσματικά την GAPDH και τη φωσφοφρουκτοκινάση όταν έχουν απενεργοποιηθεί με οξειδωση μονοθειόλης σε σουλφενικό ή σουλφινικό οξύ (Yoshitake S et al., 1994).

### **Εξειδίκευση της γλουταθειονυλίωσης**

Πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με την ειδικότητα της πρωτεϊνικής γλουταθειονυλίωσης. Είναι όλες οι ελεύθερες SH ομάδες εξίσου ευπαθείς; Έχει προταθεί ότι δύο παράγοντες καθορίζουν την επιδεκτικότητα μίας δεδομένης κυστεΐνης. Ο πρώτος είναι η προσβασιμότητα στη 3D δομή, αφού η GSH δεν είναι ένα μικρό μόριο (Casagrande, 2002). Ο άλλος καθοριστικός παράγοντας είναι η ικανότητα αντίδρασης της κυστεΐνης, η οποία καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τα γύρω αμινοξέα. Για παράδειγμα, η δημιουργία Cys-S-, η οποία μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσει για να σχηματίσει μίγμα δισουλφιδίου με GSH, ευνοείται από βασικά αμινοξέα στη γειτνίαση με αυτήν, ενώ τα όξινα γειτονικά αμινοξέα θα έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα (Friedman, 1973). Για παράδειγμα, στην περίπτωση της TRX, ένα GSH σύμπλοκο στην Cys72 θα μπορούσε επίσης να ευνοείται από την πρωτοταγή δομή όπου ένα βασικό αμινοξύ, η Lys71, θα μπορούσε να σταθεροποιήσει το σύμπλοκο πρωτεΐνης-γλουταθειόνης αλληλεπιδρώντας ηλεκτροστατικά με τη γ-γλουτάμυλο-ομάδα της GSH (Holmgren A, 1985).

Και άλλοι ειδικοί παράγοντες καθορίζουν την προσβασιμότητα μίας συγκεκριμένης κυστεΐνης στη γλουταθειονυλίωση. Συγκεκριμένα, μία γειτονική θειόλη μπορεί να ανάγει ένα μικτό δισουλφίδιο όταν σχηματιστεί. Σε συμφωνία με τα ανωτέρω, καμία από τις δύο κυστεΐνες στο ενεργό κέντρο της TRX δε σχηματίζει ένα (σταθερό) μικτό δισουλφίδιο με την GSH (Casagrande, 2002).

Στην **Εικόνα 16** περιγράφεται η μοριακή βάση της εξειδίκευσης της πρωτεϊνικής γλουταθειονυλίωσης.



**Εικόνα 16: Μοριακή βάση της εξειδίκευσης της πρωτεϊνικής S-γλουταθειονυλίωσης.**

Δεν είναι όλες οι PSHs εξίσου προσιτές στην αντίδραση με τις ROS ή τις RNS και/ή γλουταθειόνη. Τα δύο πλέον καθοριστικά στοιχεία για την επιδεκτικότητα μίας θειόλης σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, συμπεριλαμβανομένης της γλουταθειονυλίωσης, είναι η προσβασιμότητα της θειόλης μέσα στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης και η δραστικότητα του καταλοίπου κυστεΐνης, που επηρεάζεται από τα περιβάλλοντα αμινοξέα. Για παράδειγμα, τα σουλφυδρύλια των περισσότερων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών έχουν μία τιμή  $pK_a$  γύρω στο 8,5 και στο φυσιολογικά αναγωγικό περιβάλλον του κυτταροπλάσματος παραμένουν σχεδόν πλήρως πρωτονιωμένα σε φυσιολογικό pH. Συνεπώς, είναι απίθανο να S-γλουταθειονυλιωθούν. Παρόλα αυτά, οι οξειδοαναγωγικά ευαίσθητες πρωτεΐνες έχουν συγκεκριμένα κυστεϊνικά κατάλοιπα που υπάρχουν σαν σουλφυδρυλικά ανιόντα ( $PS^-$ ) σε ουδέτερο pH; αυτό οφείλεται σε ελάττωση των τιμών  $pK_a$  λόγω των αλληλεπιδράσεων φορτίων με γειτονικά θετικά φορτισμένα (δηλαδή



βασικά) αμινοξέα στην πρωτοταγή ή τριτοταγή δομή, ώστε να γίνονται «ενεργές κυστεΐνες», οι οποίες έχουν αυξημένη αντιδραστικότητα για τη γλουταθειόνη και πολλές ROS και/ή RNS. Ο σχηματισμός, λοιπόν, ενός ανιόντος σουλφυδρυλίου μίας κυστεΐνης, το οποίο μπορεί κατόπιν να αντιδράσει για να σχηματίσει μικτό δισουλφίδιο με τη γλουταθειόνη, ευνοείται από βασικά αμινοξέα στη γεινιάσή του, ενώ τα όξινα γειτονικά αμινοξέα θα έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα. Για αυτό ένα κατιονικό περιβάλλον καθιστά την -SH ιδιαίτερα δραστική και προσιτή στην S-γλουταθειονυλίωση. Άλλοι πιθανοί παράγοντες που συνεισφέρουν σε χαμηλές τιμές pKa μίας κυστεΐνης είναι οι δράσεις έλικας-διπόλου, που θεωρείται ότι μειώνουν το pKa των κυστεϊνικών καταλοίπων (π.χ. στις TRXs), καθώς και η δημιουργία δεσμών υδρογόνου των καταλοίπων κυστεΐνης με φορτισμένα κατάλοιπα, όπως η σερίνη ή η ιστιδίνη. Επιπλέον, πρωτεΐνες που περιέχουν κατάλοιπα σεληνοκυστεΐνης γλουταθειονυλιώνονται εύκολα σε ουδέτερο pH, γιατί οι τιμές pKa είναι μικρότερες του 6,0. Ιδιαίτερα προσιτές στην οξειδωση, συμπεριλαμβανομένης της γλουταθειονυλίωσης, είναι οι κυστεΐνες που προσδέονται σε κάποιο μεταλλικό ιόν, όπως σε  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ή  $Zn^{2+}$  (για παράδειγμα αυτές στη ρυθμιστική περιοχή κάποιον ισομορφών πρωτεϊνικής κινάσης C). Επίσης, η εξειδίκευση της γλουταθειονυλίωσης μπορεί να παρασχεθεί από την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική διαμερισματοποίηση και την ειδικότητα των GRXs στην ενζυμική γλουταθειονυλίωση (Dalle-Donne I et al., 2009).

#### **S-Γλουταθειονυλίωση: ρυθμιστικός μηχανισμός μεταγωγής σήματος**

Οι ποικίλες κυτταρικές επιδράσεις της γλουταθειονυλίωσης των πρωτεϊνών (Adachi T et al., 2004a; Adachi T et al., 2004b; Fiaschi T et al., 2006; Reynaert NL et al., 2006; Rinna A et al., 2006; Velu CS et al., 2007) δημιουργούν το ερώτημα σχετικά με το εάν πρόκειται για ένα μονοπάτι πρωτεϊνικής βλάβης που επάγει καταρροϊκά γεγονότα αδιακρίτως ή για έναν μηχανισμό οξειδοαναγωγικής ρύθμισης. Προκειμένου, η S-γλουταθειονυλίωση να θεωρηθεί ρυθμιστικός μηχανισμός πρέπει να πληρούνται κάποια βασικά κριτήρια (**Πίνακας 6**).

**Πίνακας 6: Κριτήρια θεώρησης της S-Γλουταθειονυλίωσης ως Ρυθμιστικού Μηχανισμού (Shelton MD et al., 2005).**

1.	Η S-Γλουταθειονυλίωση πρέπει να αλλάζει τη λειτουργία της τροποποιημένης πρωτεΐνης.
2.	Η S-Γλουταθειονυλίωση πρέπει να λαμβάνει χώρα σε ακέραια κύτταρα ως απόκριση σε φυσιολογικό ερέθισμα.
3.	Η S-Γλουταθειονυλίωση πρέπει να λαμβάνει χώρα σε σχετικά υψηλή αναλογία GSH/GSSG, δηλαδή σε φυσιολογικές συνθήκες.
4.	Πρέπει να υπάρχει ένας γρήγορος και αποτελεσματικός μηχανισμός για το σχηματισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών-SSG.
5.	Πρέπει να υπάρχει ένας γρήγορος και αποτελεσματικός μηχανισμός για την αντιστροφή της αντίδρασης S-Γλουταθειονυλίωσης.

Το κριτήριο 1 φαίνεται προφανές, αλλά οι πρωτεωμικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν πολλά παραδείγματα όπου οι τροποποιημένες στην κυστεΐνη πρωτεΐνες προσδιορίζονται πριν από αντίστοιχες αλλαγές στις δράσεις τους και πριν τεκμηριωθεί η αντίστοιχη λειτουργία. Επίσης, πολλές από τις πρωτεΐνες έχουν προσδιοριστεί μετά από επεξεργασία των κυττάρων ή των απομονωμένων πρωτεϊνών με οξειδωτικά χημικά, ως εκ τούτου, το κριτήριο 2 εστιάζει στις αποκρίσεις σε φυσιολογικά οξειδοαναγωγικά ερεθίσματα, και περιλαμβάνει το επιστέγασμα ότι πρέπει να υπάρχει ένα φυσιολογικό καταληκτικό σημείο που να διαμορφώνεται από το/ τα γεγονός/ γεγονότα γλουταθειονυλίωσης. Η αναστρέψιμη S-γλουταθειονυλίωση έχει κερδίσει έδαφος ως ρυθμιστικός μηχανισμός μέσω του χαρακτηρισμού της ενζυμολογίας του βήματος της απογλουταθειονυλίωσης (κριτήριο 5). Έτσι, η κατάλυση της πρωτεϊνικής απογλουταθειονυλίωσης αποδίδεται σαφώς στην GRX, αλλά πολύ λίγα είναι γνωστά για τους ενζυμικούς μηχανισμούς διαμόρφωσης των πρωτεϊνών-SSG (κριτήριο 4). Η απλή αντιστροφή της καταλυόμενης από την GRX αντίδρασης, δηλαδή, η μεταφορά του γλουταθειόνυλο-τμήματος από το GSSG, είναι ένας μη-πιθανός ενδοκυττάριος μηχανισμός, διότι τα περισσότερα δυναμικά οξειδοαναγωγής πρωτεϊνών-θειολών απαιτούν μια ασυνήθιστα υψηλή συγκέντρωση GSSG για το σχηματισμό των πρωτεϊνών-SSG (**Βλέπε Πίνακα 4 και Εικόνα 15**). Τα περισσότερα κατάλοιπα κυστεΐνης έχουν οξειδοαναγωγικά δυναμικά τέτοια ώστε η 50% μετατροπή της πρωτεΐνης-SH σε πρωτεΐνη-SSG να προϋποθέτει αλλαγή της ενδοκυττάριας αναλογίας GSH / GSSG από ~ 100 σε ~ 1 (Gilbert HF, 1995). Στο κριτήριο 3 αναγνωρίζεται ότι είναι απίθανο να συμβούν μεγάλες αλλαγές στο ενδοκυττάριο δυναμικό οξειδοαναγωγής υπό φυσιολογικές συνθήκες οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης, οπότε πρέπει να ανακαλυφθούν άλλοι μηχανισμοί για το σχηματισμό πρωτεΐνης-SSG πέρα από αλλαγές στην ισορροπία GSH / GSSG (Klatt P et al., 1999).

#### **Επιδράσεις της γλουταθειονυλίωσης πρωτεϊνών στα θηλαστικά**

Μέσω της τροποποίησης της ενεργότητας της πρωτεΐνης-στόχου, η γλουταθειονυλίωση οδηγεί σε λειτουργικές αλλαγές ειδικές για κάθε πρωτεΐνη (ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση), οι οποίες είναι σημαντικές στη ρύθμιση σηματοδοτικών μεσολαβητών σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες και, κατά αυτόν τον τρόπο έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει κυτταρικά γεγονότα, τόσο άμεσα όσο και έμμεσα, σε κύτταρα θηλαστικών και φυτών, στις ζύμες και στα βακτήρια.

- **Ρόλος στο μεταβολισμό.** Το γλυκολυτικό ένζυμο GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης), το οποίο έχει πρωταρχικό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας και σε μία ποικιλία σημαντικών μονοπατιών του πυρήνα (π.χ.: ρύθμιση απόπτωσης, επιδιόρθωση DNA, έξοδος του RNA από τον πυρήνα) απενεργοποιείται μέσω S-γλουταθειονυλίωσης σε ένα *in vitro* σύστημα χρησιμοποιώντας καθαρισμένο ανθρώπινο δισουλφίδιο γλουταθειόνης (GSSG) (Cotgreave IA et al., 2002). Ακόμα, πρόσφατα δείχτηκε ότι το GAPDH αποτελεί την πλέον άφθονη και σημαντική πρωτεΐνη που προσδένει σε στοιχεία πλούσια σε αδενίνη και ουριδίνη της 3' μη-μεταφραζόμενης περιοχής του mRNA της ET-1 (Ενδοθηλίνη-1) σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Αυτή η αλληλεπίδραση συσχετίζεται με μειωμένη έκφραση της ET-1 μέσω αποσταθεροποίησης του mRNA. Το οξειδωτικό στρες αλλοιώνει την πρόσδεση του GAPDH στο mRNA και την ικανότητά του να ρυθμίζει την έκφραση της ET-1, το οποίο είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει μέσω ειδικής S-

γλουταθεινουλίωσης του καταλυτικά ενεργού καταλοίπου Cys152 (Rodriguez-Pascual F et al., 2008).

Άλλα γλυκολυτικά ένζυμα (κινάση του πυρουβικού, αλδολάση, κινάση του φωσφογλυκερικού και ισομεράση της φωσφορικής τριόζης) μπορούν να υποστούν S-γλουταθεινουλίωση σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα αρουραίου και σε ανθρώπινα HepG2 κύτταρα ηπατώματος υπό τεχνητές οξειδωτικές συνθήκες ( $H_2O_2$ , διαμίδιο ή μεναδιόνη) (Fratelli M et al., 2003), δείχνοντας έτσι ότι η S-γλουταθεινουλίωση μπορεί να συντονίσει τον κυτταρικό μεταβολισμό ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες ρυθμίζοντας τη γλυκόλυση. Αρκετά άλλα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της ενέργειας και έχουν μία κυστεΐνη στο ενεργό τους κέντρο αναστέλλονται από την S-γλουταθεινουλίωση, όπως η αφυδρογονάση του α-κετογλουταρικού (Applegate MA et al., 2008) και η μιτοχονδριακή NADP+-εξαρτώμενη αφυδρογονάση του ισοκιτρικού (Kil IS and Park JW, 2005) (ένα σημαντικό ένζυμο στην κυτταρική άμυνα ενάντια της οξειδωτικής βλάβης, που παρέχει NADPH στα μιτοχόνδρια, το οποίο είναι απαραίτητο για την αναγέννηση της μιτοχονδριακής GSH ή TRX).

Στο μετα-ισχαιμικό μυοκάρδιο, η αξιοσημείωτη απώλεια της ενεργότητας του μιτοχονδριακού συμπλόκου II συσχετίζεται με την απογλουταθεινουλίωση της 70-kDa υπομονάδας του ενζύμου που προσδένει το φλαβινο-αδενινο νουκλεοτίδιο, υποδεικνύοντας ότι η S-γλουταθεινουλίωση ενεργοποιεί το σύμπλοκο II *in vivo* (Chen YR et al., 2007). Πρόσφατα, δείχτηκε ότι το σύμπλοκο I σε άθικτα μιτοχόνδρια καρδιάς θηλαστικών, στα οποία έχει προκληθεί οξειδωτικό στρες μέσω διαμιδίου, είναι S-γλουταθεινουλιωμένο στις κυστεΐνες 531 και 704 της 75-kDa υπομονάδας, οι οποίες βρίσκονται στην επιφάνεια του συμπλόκου I στα θηλαστικά και εκτεθειμένα στη μιτοχονδριακή δεξαμενή GSH (Hurd TR et al., 2008). Η S-γλουταθεινουλίωση του συμπλόκου I συμβαίνει και μετά από ήπιο οξειδωτικό στρες λόγω αυξημένης παραγωγής ανιόντος υπεροξειδίου από την αναπνευστική αλυσίδα (Hurd TR et al., 2008). Συνεπώς, οι κυστεΐνες 531 και 704 θα μπορούσαν να είναι σημαντικές στην αποφυγή της οξειδωτικής βλάβης του συμπλόκου I αντιδρώντας με τις ROS και ανακυκλώνοντας, μέσω της επικείμενης S-γλουταθεινουλίωσης, τις θειουλ-ρίζες και τα σουλφενικά οξέα που σχηματίζονται στα κυστεϊνικά κατάλοιπα σε ελεύθερες θειόλες.

- **Ρόλος στη σηματοδότηση.** Πολλά σηματοδοτικά μόρια και μεταγραφικοί παράγοντες ουσιώδεις για την κυτταρική ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση ή την απόπτωση ρυθμίζονται μέσω S-γλουταθεινουλίωσης. Θα αναφερθούμε ενδεικτικά σε κάποια εξ αυτών. Στην κυτταρική σειρά NR8383 των μακροφάγων των κυψελίδων αρουραίου, οι ROS που παράγονται μέσω της ADP-προκαλούμενης αναπνευστικής έκρηξης επάγουν το σχηματισμό ενός δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ PTP1B και GSH (Rinna A et al., 2006). Μετά την πρόκληση οξειδωτικού στρες με μεναδιόνη, γλουταθεινουλιώνεται η κινάση MEKK1 (MAPK/ERK kinase kinase, κινάση της κινάσης της MAPK ή της ERK). Η παραπάνω S-γλουταθεινουλίωση παρεμβάλλεται στην πρόσδεση του ATP στην πλούσια σε γλυκίνη θηλειά της υπο-περιοχής I της επικράτειας κινάσης της MEKK1 προκαλώντας την αναστολή της καταλυτικής της ενεργότητας (Cross JV and DJ., 2004). Έτσι, η S-γλουταθεινουλίωση μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν γενικό μηχανισμό μέσω του οποίου

ρυθμίζεται η λειτουργία πρωτεϊνικής κινάσης αποτρέποντας τη φωσφορυλίωση της θηλειάς ενεργοποίησης ή αλλάζοντας τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-υποστρώματος. Επίσης, μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι Jun και NF-κB, αναστέλλονται από τη γλουταθειονυλίωση (Klatt P et al., 1999; Pineda-Molina E et al., 2001), ενώ έχουν δημοσιευθεί ενδείξεις για αυτή τη δράση και για τον ATF (activating transcription factor, μεταγραφικός παράγοντας-ενεργοποιητής) /CREB (cyclic AMP-responsive element binding protein, πρωτεΐνη που προσδένει στο στοιχείο που αποκρίνεται στο κυκλικό AMP) (Brag, 2004). Στην περίπτωση των μεταγραφικών παραγόντων, η αναστολή πιθανότατα συμβαίνει μέσω της αναστολής της πρόσδεσης στο DNA, καθώς η γλουταθειονυλίωση προσθέτει τα δύο αρνητικά φορτία του GSH (αυτό του γ-γλουταμικού οξέος και του καρβοξυτελικού άκρου της γλυκινής) στη θετικά φορτισμένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA της πρωτεΐνης, που με τη σειρά τους εξασθενίζουν την πρόσδεση στο αρνητικά φορτισμένο DNA (Klatt P et al., 1999; Pineda-Molina E et al., 2001). Όσον αφορά τον NF-κB υπάρχουν ενδείξεις για τη γλουταθειονυλίωση της p65 (Qanungo S et al., 2007), καθώς και μία μελέτη που επιδεικνύει την S-γλουταθειονυλίωση της απομονωμένης p50 υπομονάδας (Pineda-Molina E et al., 2001). Ωστόσο, άμεση απόδειξη (π.χ. μέσω φασματομετρίας μάζας) της γλουταθειονυλίωσης της p50 ή της p65 *in vivo* δεν έχει γίνει. Παράλληλα, πρόσφατα αναφέρθηκε γλουταθειονυλίωση της β-υπομονάδας της IKK (IkB kinase, κινάση της IkB) στην κυστεΐνη 179 μετά την επίδραση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, η οποία αναστέλλει την ενεργότητα κινάσης και άρα την ενεργοποίηση του NF-κB, ο οποίος παραμένει σε αδρανή μορφή στο κυτταρόπλασμα (Reynaert NL et al., 2006). Η GRX αντιστρέφει την κατάσταση αυτή και αποκαθιστά την ενεργότητα κινάσης. Για αυτό, η S-γλουταθειονυλίωση φαίνεται να αποτελεί έναν φυσιολογικό μηχανισμό για τον έλεγχο της οξειδοαναγωγικής ρύθμισης του μονοπατιού ενεργοποίησης του NF-κB σε διάφορα επίπεδα.

Ωστόσο, η γλουταθειονυλίωση δεν έχει πάντα ανασταλτικό ρόλο. Αυξημένα επίπεδα οξειδωτικών τόσο σε ενδοθηλιακά όσο και σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα μπορούν άμεσα να ενεργοποιήσουν τη μικρή GTPάση p21ras μέσω γλουταθειονυλίωσης στην κυστεΐνη 118; έτσι αυξάνεται η ενεργότητα της p21ras και μεσολαβείται η καταρροϊκή σηματοδότηση μέσω φωσφορυλίωσης των ERK (πρωτεϊνική κινάση που ρυθμίζεται από εξωκυττάρια σήματα) και AKT (Adachi T et al., 2004a; Clavreul N et al., 2006a). Επιπλέον, η S-γλουταθειονυλίωση και η μετέπειτα ενεργοποίηση της p21ras από το περοξυνιτρικό μεσολαβεί την αντίσταση στην ινσουλίνη των ενδοθηλιακών κυττάρων που προκαλείται από οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας μέσω της ERK-εξαρτώμενης αναστολής του μονοπατιού της ινσουλίνης (Clavreul N et al., 2006b). Η ROS-εξαρτώμενη S-γλουταθειονυλίωση της Ras στην κυστεΐνη 118 μεσολαβεί επίσης την επαγόμενη από το στέλεχος υπερτροφία των καρδιομυοκυττάρων. Η τροποποίηση αναστέλλεται από την υπερέκφραση της GRX1 (Pimentel DR et al., 2006).

Πρόσφατα αποτελέσματα από ενδοθηλιακά κύτταρα παρέχουν στοιχεία ότι η S-γλουταθειονυλίωση της κασπάσης-3 αναστέλλει τη διάσπασή της και ότι η TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκου)-α-επαγόμενη απόπτωση σε αυτά τα κύτταρα σχετίζεται με την GRX-καταλυόμενη απογλουταθειονυλίωση της κασπάσης-3 (Pan S and Berk BC, 2007), αποκαλύπτοντας έτσι έναν καινούριο ρυθμιστικό μηχανισμό στο μονοπάτι του

κυτταρικού θανάτου που εκκινείται από τον TNF- $\alpha$  (Huang Z et al., 2008; Pan S and Berk BC, 2007).

- **Ρόλος στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση.** Σε αντίθεση με άλλα ένζυμα τα οποία αναστέλλονται από την S-γλουταθειονυλίωση μίας κυστεΐνης του ενεργού τους κέντρου, η TRX σε ανθρώπινα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος φαίνεται να αναστέλλεται προσωρινά μετά τη χορήγηση διαμιδίου λόγω της S-γλουταθειονυλίωσης μίας κυστεΐνης εκτός του ενεργού κέντρου (Casagrande S et al., 2002).

- **Ρόλος στη ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου και στην ενεργότητα καναλιών ιόντων.** Η S100A1 αποτελεί μία τυπική εκπρόσωπο μίας ομάδας πρωτεϊνών με EF-hand που προσδέσνουν ασβέστιο και αποτελούν την οικογένεια S100. Η συγγένεια της S100A1 για το ασβέστιο αυξάνεται δραματικά όταν η θειόλη της κυστεΐνης 85 των  $\alpha$  υπομονάδων της σχηματίζει μικτό δισουλφίδιο μετά την έκθεση σε περίσσεια GSSG *in vitro* (Goch G et al., 2005).

Η ATPάση ασβεστίου του σαρκοπλασματικού δικτύου SERCA, η οποία μεταφέρει  $Ca^{2+}$  από το κυτταρόπλασμα στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου καταναλώνοντας ATP κατά τη μυϊκή χαλάρωση, ενεργοποιείται μέσω S-γλουταθειονυλίωσης η οποία επάγεται από το περοξυνιτρικό τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* σε άθικτες αρτηρίες (Adachi T et al., 2004a; Ying J et al., 2007). Παρόμοια, η ROS-επαγόμενη S-γλουταθειονυλίωση και η σχετική ενεργοποίηση των υποδοχέων ρυανοδίνης διεγείρει την απελευθέρωση ασβεστίου από τις ενδοκυττάρια αποθήκες στους γραμμικούς μυς και σε νευρικά κύτταρα, διαδικασία απαραίτητη τόσο για τη σύσπαση των γραμμωτών μυών όσο και για ποικίλες λειτουργίες των νευρώνων συμπεριλαμβανομένης της πλαστικότητας των συνάψεων (Hidalgo C et al., 2006; Kemmerling U et al., 2007; Sanchez G et al., 2005).

Αντιθέτως, η ενεργότητα του καναλιού χλωρίου CFTR (διαμεμβρανικός ρυθμιστής αγωγιμότητας κατά την κυστική ίνωση) σε αποκομμένες μεμβρανικές πλάκες αναστέλλεται αξιοσημείωτα από οξειδωμένες μορφές γλουταθειόνης που επάγουν τη γλουταθειονυλίωση μίας κυστεΐνης, ενώ η δράση αυτή αντιστρέφεται από την GRX1 ή τη διθειοτριτόλη (Wang W et al., 2005).

- **Ρόλος στη ρύθμιση της συγκρότησης του κυτταροσκελετού.** Έχει δειχθεί ότι η S-γλουταθειονυλίωση/ απογλουταθειονυλίωση της ακτίνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση του κυτταροσκελετού μετά τη δράση αυξητικών παραγόντων (Dalle-Donne I et al., 2003a; Dalle-Donne I et al., 2003b; Wang J et al., 2001; Wang J et al., 2003), κατά την ιντεγκρινο-μεσολαβούμενη κυτταρική πρόσφυση (Fiaschi T et al., 2006), καθώς και σε καρδιομυοκύτταρα σε μοντέλα-βλάβης από ισχαιμία/ επανεμποτισμό (Chen FC and Ogut O, 2006).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η γλουταθειονυλίωση δεν αντιστοιχεί με κλείδωμα της κυστεΐνης του ενεργού κέντρου με αλκυλιωτικό παράγοντα ή με μετάλλαξη της κυστεΐνης-στόχου. Για παράδειγμα, ο μεταλλαγμένος c-Jun στον οποίον λείπει η κυστεΐνη που γλουταθειονυλιώνεται μπορεί ακόμα να δέσει στο DNA, αλλά δεν ανταποκρίνεται στην οξείδωση της θειόλης. Στην πραγματικότητα, σε αντίθεση με το κλείδωμα μίας κυστεΐνης, η πρόσδεση του τριπεπτιδίου GSH σε μία πρωτεΐνη επηρεάζει την δραστηριότητα του λόγω στερικής παρεμπόδισης ή αλλαγών στο ισοηλεκτρικό σημείο του. Με τον τρόπο αυτό, η γλουταθειονυλίωση είναι διαφορετική από τις άλλες μορφές της σουλφυδρυλίωσης. Για

παράδειγμα, η γλουταθειονυλίωση αναστέλλει πολλά ισοενζύμα της πρωτεϊνικής κινάσης C, ενώ η κυστεϊνυλίωση δεν επηρεάζει τη δραστηριότητά τους (Chu, 2001). Η γλουταθειονυλίωση μπορεί να έχει και άλλες επιδράσεις στα ένζυμα και στην περίπτωση της HIV-1 πρωτεάσης η γλουταθειονυλίωση της Cys 95 αναστέλλει τη δράση, αλλά η γλουταθειονυλίωση της Cys 67 σταθεροποιεί το ένζυμο (Davis DA et al., 1996).

Η γλουταθειονυλίωση μπορεί να έχει άλλες λειτουργίες από εκείνες που μπορούν να θεωρηθούν ως γενικά προστατευτικές ή αντιοξειδωτικές. Εάν μία κυστεΐνη γλουταθειονυλιωθεί, δεν είναι διαθέσιμη για άλλες οξειδωτικές αντιδράσεις. Από την άποψη αυτή, η γλουταθειονυλίωση θεωρείται συχνά ως ένας τρόπος για την προστασία των ευαίσθητων κυστεϊνών από άλλες, ενδεχομένως ανεπανόρθωτες, μορφές οξείδωσης, επιτρέποντας έτσι στο κύτταρο να αποκαταστήσει τη σχετική λειτουργία της πρωτεΐνης όταν ξεπεραστούν οι οξειδωτικές συνθήκες στρες. Τέλος, η γλουταθειονυλίωση μπορεί να χρησιμεύσει ως μέσο για την αποθήκευση GSH στο κύτταρο κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες. Στην πραγματικότητα, όταν η GSH οξειδώνεται σε GSSG, το τελευταίο στη συνέχεια εξάγεται από το κύτταρο (Sies, 1984).

### 1.3 ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΝΟΣΙΑΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ

Το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών αποτελείται από δύο διακριτά, αλλά αλληλοεξαρτώμενα συστατικά: το φυσικό και το προσαρμοζόμενο ανοσοποιητικό σύστημα. Η φυσική ανοσιακή απάντηση είναι υπεύθυνη για την αρχική ανίχνευση και καταστροφή των «εισβολέων». Η ανίχνευση βασίζεται σε μία περιορισμένη ομάδα υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβου (pattern-recognition receptors, PRRs) που κωδικοποιούνται στη βλαστική σειρά. Αντιθέτως, η επακόλουθη προσαρμοζόμενη ανοσιακή απάντηση βασίζεται για την ανίχνευση των «εισβολέων» σε τεράστιο αριθμό διακριτών υποδοχέων που προέρχονται από τυχαίες γονιδιακές αναδιατάξεις, ενώ παρέχει στον ξενιστή ανοσολογική μνήμη (Janeway and Medzhitov, 2002). Επιπλέον, η φυσική ενδογενής απόκριση κινητοποιεί και διαμορφώνει τις προσαρμοζόμενες ανοσιακές αποκρίσεις των T- και B-κυττάρων (Pulendran and Ahmed, 2006). Η προσαρμοζόμενη ανοσιακή απόκριση δεν εξαρτάται μόνο από την προηγηθείσα φυσική απόκριση, αλλά την επηρεάζει κιάλας οδηγώντας σε συνεργιστική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών κλάδων για την απομάκρυνση του παθογόνου (Hoebe et al., 2004). Το φυσικό ανοσοποιητικό σύστημα επιτρέπει, επίσης, το εσωτερικό περιβάλλον του ξενιστή να ανιχνεύσει πιθανές ενδογενείς ανωμαλίες (Medzhitov and Janeway, 2002).

Προκειμένου να κινητοποιηθούν οι ανοσιακές αποκρίσεις, οι PRRs αναγνωρίζουν μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με τα παθογόνα (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) και επάγουν αρκετούς εξωκυττάρους καταρράκτες ενεργοποίησης, όπως τα μονοπάτια του συμπληρώματος και ποικίλα ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης, οδηγώντας σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Αυτές οι αποκρίσεις είναι ουσιώδεις για την αποτελεσματική απομάκρυνση των παθογόνων, αλλά οι αποκρίσεις υπερενεργοποίησης ενδέχεται να αποδειχθούν επικίνδυνες για τον ξενιστή (π.χ. περιπτώσεις σήψης) (Poltorak et al., 1998). Για το λόγο αυτόν, οι αποκρίσεις ελέγχονται αυστηρά από σχετιζόμενες θηλιές αρνητικής ανάδρασης ή/και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, όπως ο παράγοντας-β ανάπτυξης όγκου (tumour growth factor, TGFβ), η ιντερλευκίνη (interleukin, IL)-10 και οι στεροειδείς ορμόνες. Σε πολλές περιπτώσεις, αρκετοί PRRs αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο παθογόνο παράλληλα ή διαδοχικά, ενεργοποιώντας διακριτά και κοινά μονοπάτια. Έτσι αυξάνεται η πιθανότητα αλληλεπίδρασης

μεταξύ των μονοπατιών, καθώς και με άλλα ανοσορυθμιστικά σηματοδοτικά μονοπάτια δημιουργώντας ένα συγκεκριμένο φλεγμονώδες περιβάλλον. Τελικά, με αυτόν τον τρόπο καθορίζεται η ειδική ανοσιακή απόκριση που στοχεύει στην απομάκρυνση του παθογόνου.

**Υποδοχείς Αναγνώρισης Μοτίβου:** Το φυσικό ανοσιακό σύστημα χρησιμοποιεί PRRs που βρίσκονται σε τρία διαφορετικά διαμερίσματα: σωματικά υγρά, κυτταρικές μεμβράνες και κυτταρόπλασμα. Οι PRRs στα σωματικά υγρά διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στον οψωνισμό του PAMP, στην ενεργοποίηση των μονοπατιών του συμπληρώματος και σε κάποιες περιπτώσεις στη μεταφορά των PAMPs σε άλλους PRRs (Garlanda et al., 2005; Gasque, 2004; Ulevitch and Tobias, 1995).

Οι PRRs που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη (π.χ. TLRs, Toll-like receptors, υποδοχείς που μοιάζουν με τον Toll) έχουν ποικίλες λειτουργίες, όπως την παρουσίαση των PAMPs σε άλλους PRRs, την προώθηση της μικροβιακής πρόσληψης μέσω φαγοκυττάρωσης και την κινητοποίηση σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών (Beutler et al., 2006; Brown, 2006; Jiang et al., 2005; Lee et al., 2006; Underhill and Ozinsky, 2002).

Οι κυτταροπλασματικοί PRRs μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες: πρωτεΐνες που επάγονται από την ιντερφερόνη (interferon, IFN), ελικάσες με περιοχή προσέλκυσης κασπασών (caspase-recruiting domain, CARD) και υποδοχείς NLRs [NOD (nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptors, υποδοχείς που μοιάζουν με περιοχή ολιγομερισμού που προσδέει νουκλεοτίδια]. Οι πρωτεΐνες που επάγονται από την IFN, όπως η κινάση που εξαρτάται από το δίκλωνο RNA (dsRNA-dependent protein kinase, PKR) και η 2'-5' ολιγοαδενυλική συνθετάση (2'-5' oligo-Adenylate synthetase, OAS) (Stark, 1998), καθώς και οι CARD ελικάσες, όπως η RIG-1 (retinoic acid inducible gene-1, γονίδιο-1 που επάγεται από το ρετινοϊκό οξύ) και η MDA5 (melanoma differentiation-associated gene-5, γονίδιο-5 που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση του μελανώματος) εμπλέκονται στην αντι-ικκή άμυνα. Αντίθετα, οι NLRs συμμετέχουν κυρίως στις αντιβακτηριακές ανοσιακές αποκρίσεις.

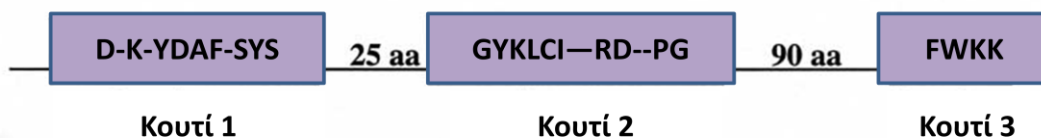
Αρκετοί PRRs αναγνωρίζουν επίσης ενδογενή συστατικά του ξενιστή, όπως αποπτωτικά κύτταρα των οποίων και υποκινούν τη φαγοκυττάρωση (Mariathasan et al., 2006; Taylor et al., 2005).

### **1.3.1 Η Υπεροικογένεια TLR / IL-1R**

Η φυσική ανοσία, λοιπόν, αποτελεί μία πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον των παθογόνων μικροοργανισμών. Η ενεργοποίηση του φυσικού ανοσιακού συστήματος από τους TLRs ενεργοποιεί το προσαρμοσμένο ανοσιακό σύστημα μέσω της παραγωγής προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένων των IL-1, 6, 12 και του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor, TNF), καθώς και την επαγωγή καθοριστικών μορίων της κυτταρικής επιφάνειας, τα οποία καθοδηγούν την ενεργοποίηση των T-κυττάρων, όπως είναι τα MHC (major histocompatibility complex, μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας), CD40, CD80 και CD86. Οι παραγόμενες κυτοκίνες (π.χ. η IL-1) επάγουν έντονη θετική ανάδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα, η οποία, εάν δεν ελεγχθεί σωστά, μπορεί να προκαλέσει καταστροφικές ασθένειες, όπως χρόνια αρθρίτιδα και φλεγμονώδεις ασθένειες του εντέρου. Παράλληλα, έχει δειχθεί ότι τα συμβιωτικά βακτήρια αναγνωρίζονται από τους TLRs υπό φυσιολογικές συνθήκες και ότι αυτή η αλληλεπίδραση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του εντερικού επιθηλίου (Rakoff-Nahoum S et al., 2004). Για αυτό είναι ουσιώδες να διερευνηθούν οι

λεπτομερείς μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων οι υποδοχείς Toll/ IL-1 (TIR) μεσολαβούν τη σηματοδότηση και πώς τα μονοπάτια αυτά ρυθμίζονται με το μακροπρόθεσμο στόχο να αναπτυχθούν πλέον αποτελεσματικά αντιφλεγμονώδη μικρά μοριακά φάρμακα.

Μέλη της υπερικογένειας των TIRs έχουν περιγραφεί σε σπονδυλωτά, ασπόνδυλα και φυτά. Κάποια εξ αυτών των μελών είναι σημαντικά σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια της οντογένεσης, με τον Toll της *Drosophila* να αποτελεί το καλύτερα χαρακτηριζόμενο αντιπρόσωπο αυτής της ομάδας, ο οποίος εμπλέκεται στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και στη ραχιαίο-κουλιακή πολικότητα των εντόμων (Martin MU and Wesche H, 2002). Ο κύριος λειτουργικός ρόλος για την ομαδοποίηση αυτών των μορίων είναι ότι όλα τα μέλη της TIR υπερικογένειας εμπλέκονται στην προστασία ενήλικων οργανισμών ζώων ή φυτών ενάντια σε μολύνσεις από ιούς, βακτήρια ή πρωτόζωα (O'Neill LA and Dinarello CA, 2000). Πέρα από τη βιολογική τους λειτουργία, υπάρχει ένας επιπλέον σαφής δομικός ρόλος για να ομαδοποιηθούν αυτά τα ποικίλα μόρια σε μία υπερικογένεια: μοιράζονται ένα κοινό ενδοκυττάριο μοτίβο το οποίο είναι απαραίτητο για τη σηματοδότηση αυτών των προσαρμοστών ή υποδοχέων. Το μοτίβο αποκαλείται TIR (O'Neill L, 2000) (**Εικόνα 17**). Οι αλληλεπιδράσεις της περιοχής TIR ανάμεσα σε υποδοχείς και προσαρμοστές διαδραματίζουν ρόλο-κλειδί στην ενεργοποίηση συντηρημένων κυτταρικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος ως απόκριση σε βακτηριακό LPS, μικροβιακά και ιικά παθογόνα, κυτοκίνες και αναπτυξιακούς παράγοντες. Η σηματοδότηση από τον υποδοχέα θεωρείται ότι επιτυγχάνεται μέσω ομοτυπικών (homotypic) και ετεροτυπικών (heterotypic) αλληλεπιδράσεων. Η ενεργοποίηση περιλαμβάνει την απελευθέρωση του NF-κΒ που οδηγεί στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, στην αλλαγή του ιστύπου της ανοσοσφαιρίνης και στην έκφραση των κυτοκινών και των υποδοχέων τους (Brikos C and O'Neill LA, 2008; Fitzgerald KA and O'Neill LA, 2000).



**Εικόνα 17.** Συναινετική αλληλουχία της περιοχής TIR βασισόμενη στη σύγκριση αλληλουχίας 31 μελών της οικογένειας.

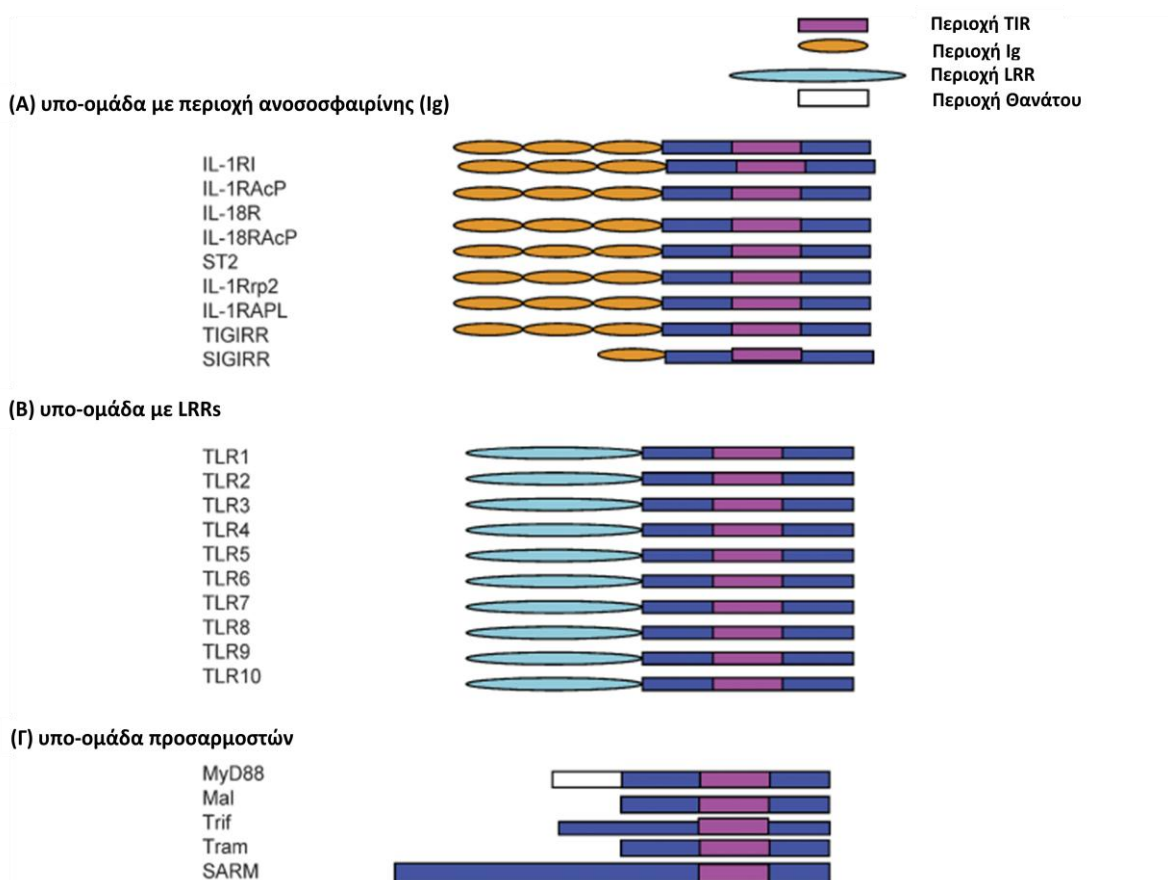
Η περιοχή TIR αποτελείται από τρία «κουτιά» συντηρημένων καταλοίπων, τα οποία είναι τοποθετημένα σε μία αλληλουχία-πυρήνα 135-160 αμινοξέων. Τα ενδιάμεσα αμινοξέα μπορεί να ποικίλουν, αφού η συντηρημένη αλληλουχία μεταξύ των διάφορων περιοχών είναι μόλις 20-30%. Δύο συνδετικές επιφάνειες ευθύνονται για τη διαμεσολάβηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των περιοχών TIR, οι οποίες περιλαμβάνουν ολιγομερισμό υποδοχέα/προσαρμοστή και «συνεργασία» μεταξύ υποδοχέων και προσαρμοστών (Fitzgerald KA and O'Neill LA, 2000).

Η υπερικογένεια αυτή μπορεί να διαιρεθεί σε δύο υπο-ομάδες βάσει των εξωκυττάρων περιοχών (**Εικόνα 17**): τους υποδοχείς που περιέχουν επικράτεια ανοσοσφαιρίνης (Immunoglobulin, Ig) (Mitcham JL et al., 1996) και εκείνους που έχουν μοτίβο επαναλήψεων πλούσιων σε λευκίνη (leucine-rich repeats, LRRs) (Medzhitov R et al., 1997). Τέλος, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η περιοχή TIR υπάρχει και σε άλλες πρωτεΐνες-προσαρμοστές που



έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και από τις δύο παραπάνω υπο-ομάδες, π.χ. στη μυελοειδή πρωτεΐνη διαφοροποίησης (myeloid differentiation, MyD) 88 (Burns K et al., 1998; Wesche H et al., 1997).

**Η υπο-ομάδα του IL-1R1:** Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18**, αυτή η υπο-οικογένεια αποτελείται από εννέα μέλη και όλα περιέχουν εξωκυττάριας Ig περιοχές, καθώς και την TIR περιοχή ενδοκυττάρια. Η επικράτεια Ig αποτελείται από περίπου 110 αμινοξέα και μέσα σε κάθε περιοχή, ένας ενδο-αλυσιδικός δισουλφιδικός δεσμός σχηματίζει μία χαρακτηριστική θηλιά περίπου 60 αμινοξέων, την αποκαλούμενη αναδίπλωση ανοσοσφαιρίνης (Martin MU and Wesche H, 2002).



**Εικόνα 18.** Η υπεροικογένεια TIR στον άνθρωπο.

Η υπο-οικογένεια του IL-1R **(Α)** έχει εξωκυττάριας περιοχές ανοσοσφαιρίνης (Ig) που είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση του προσδέτη. Η υπο-οικογένεια των TLRs **(Β)** έχει LRRs. Τέλος, υπάρχουν πέντε σηματοδοτικοί προσαρμοστές **(Γ)** (O'Neill LA, 2008).

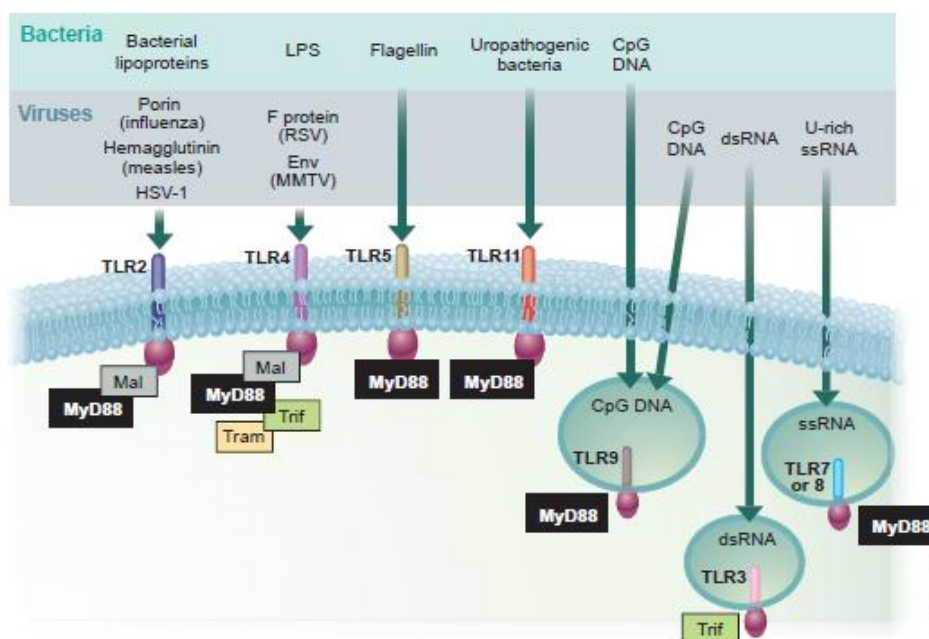
IL-1RAcP: βοηθητική πρωτεΐνη του IL-1R, IL-1RAPL: πρωτεΐνη που μοιάζει με τη βοηθητική πρωτεΐνη του IL-1R, IL-1Rrp: συγγενική πρωτεΐνη του IL-1R, TIGIRR: συγγενική πρωτεΐνη του IL-1R με τρεις περιοχές ανοσοσφαιρίνης, SIGIRR: συγγενικό μόριο του IL-1R με μία περιοχή ανοσοσφαιρίνης, MAL: όμοια με τον προσαρμοστή MyD88, TRIF: πρωτεΐνη-προσαρμοστής που περιέχει TIR και επάγει την IFN- $\beta$ , TRAM: TRIF-σχετιζόμενο μόριο-προσαρμοστής, SARM: πρωτεΐνη που περιέχει SAM και ARM περιοχές.

Οι υποδοχείς της ομάδας αυτής έχουν τρεις τέτοιες περιοχές με εξαίρεση το SIGIRR (single immunoglobulin IL-1R related molecule, συγγενικό μόριο του IL-1R με μία περιοχή ανοσοσφαιρίνης), ο οποίος, όπως δηλώνει το όνομα, έχει μία περιοχή Ig (Thomassen E et al., 1999). Είναι προφανές ότι οι Igs περιοχές του IL-1RI, σε συνδυασμό με την περιοχή TIR, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη φυσική ανοσία, ωστόσο από εξελικτική σκοπιά, η περιοχή Ig έχει κυρίαρχο ρόλο και στην προσαρμοσμένη ανοσιακή απόκριση, αφού σχηματίζει τη βασική δομή των αντισωμάτων και το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα των T-κυττάρων (T-cell receptor, TCR) και των συνοδευτικών αλυσίδων CD3 $\gamma$ ,  $\epsilon$  και  $\delta$ . Αυτό που ξεχωρίζει την Ig περιοχή από αυτή την άποψη είναι η μεταβλητή περιοχή που μπορεί να δημιουργήσει τεράστια ποικιλομορφία, παρέχοντας τη βάση για την αναγνώριση υψηλής συγγένειας αντιγονικών πεπτιδίων και για την προσαρμοσμένη ανοσία.

**Η υπο-ομάδα των TLRs:** Η ανακάλυψη των TLRs αύξησε σε μεγάλο βαθμό τον αριθμό των πρωτεϊνών με TIR περιοχές. Δοθείσης της περιγραφής πέντε TLRs το 1997 και της αξιοσημείωτης συντήρησής τους σε διάφορα είδη (Rock FL et al., 1998), προτάθηκε ότι έχουν κάποιο ρόλο στη φυσική ανοσία. Έτσι, πολλοί ερευνητές εμπνεύστηκαν για να διερευνήσουν αυτή την πιθανότητα με αποτέλεσμα την αναζωογόνηση του ενδιαφέροντος για τη φυσική ανοσία και, τελικά, την περιγραφή υποδοχέων απαραίτητων για την έναρξη της άμυνας του ξενιστή και για την επίλυση σημαντικών ερωτημάτων για τον τρόπο που ανιχνεύονται παράγοντες που απελευθερώνονται από τα παθογόνα.

Έρευνες ομόλογων αλληλουχιών στα γονιδιώματα των θηλαστικών οδήγησαν στην ταυτοποίηση τουλάχιστον 13 μελών των TLRs στα θηλαστικά (10 στον άνθρωπο, 13 στον ποντικό) (Brikos C and O'Neill LA, 2008). Οι TLRs είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες τύπου I και χαρακτηρίζονται από την παρουσία μοτίβων LRRs στην εξωκυττάρια περιοχή και από μία κυτταροπλασματική σηματοδοτική TIR περιοχή (Bowie A and O'Neill LA, 2000). Οι LRR περιοχές αποτελούνται από 19–25 διαδοχικά LRR μοτίβα, καθένα εκ των οποίων συνίσταται από 24–29 αμινοξέα και περιέχει το μοτίβο XLXXLXLXX, καθώς και άλλα συντηρημένα κατάλοιπα (X $\emptyset$ XX $\emptyset$ XXXXFXXLX;  $\emptyset$  = υδρόφοβο αμινοξύ). Κάθε LRR αποτελείται από μία  $\beta$ -πτυχωτή επιφάνεια και μία  $\alpha$ -έλικα που συνδέονται μέσω θηλιών. Βάσει της πρωτοταγούς τους αλληλουχίας οι TLRs μπορούν να διαιρεθούν περαιτέρω σε αρκετές υπο-οικογένειες, κάθε μία από τις οποίες αναγνωρίζει σχετιζόμενα PAMPs (μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με το παθογόνο): για παράδειγμα, οι TLR1, TLR2 και TLR6 αναγνωρίζουν λιπίδια, ενώ οι στενά συγγενικοί TLR7, TLR8 και TLR9 αναγνωρίζουν νουκλεϊκά οξέα (**Εικόνα 19**). Το ασύνηθες με τους TLRs, ωστόσο, είναι ότι κάποιοι μπορούν να αναγνωρίσουν αρκετά δομικά μη-συγγενικούς προσδέτες. Για παράδειγμα, ο TLR4 αναγνωρίζει μία πολύ αποκλίνουσα συλλογή προσδετών, όπως το LPS (λιποπολυσακχαρίτες), το φυτικό diterpene *raclitaxel*, την πρωτεΐνη σύντηξης του συγκυτιακού ιού του αναπνευστικού (RSV), τη φμπρονεκτίνη και πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP). Οι TLRs εκφράζονται σε διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού, συμπεριλαμβανομένων μακροφάγων, δενδριτικών κυττάρων (DCs), B-κυττάρων, συγκεκριμένων τύπων T-κυττάρων, ακόμα και σε μη-ανοσοποιητικά κύτταρα, όπως σε ινοβλάστες και επιθηλιακά. Η έκφραση των TLRs δεν είναι σταθερή, αλλά ρυθμίζεται άμεσα ως απόκριση σε παθογόνα, σε μία ποικιλία κυτοκινών και σε περιβαλλοντικό στρες. Επιπρόσθετα, οι TLRs μπορούν να εκφράζονται εξω- ή ενδο-κυττάρια. Αν και κάποιοι TLRs (TLRs 1, 2, 4, 5 και 6) εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια, άλλοι (TLRs 3, 7, 8 και 9) βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά σε ενδοκυττάρια διαμερίσματα (π.χ. σε ενδοσώματα) και οι προσδέτες τους,

κυρίως νουκλεϊκά οξέα, χρειάζεται να εισέλθουν στο οργανίδιο προκειμένου να λάβει χώρα η σηματοδότηση (Akira S et al., 2006).



**Εικόνα 19. Αναγνώριση παθογόνων από τους TLRs.**

Οι TLRs στις μεμβράνες των δενδριτικών κυττάρων ανιχνεύουν πρωτεΐνες ή λιπίδια από βακτήρια ή ιούς. Οι TLRs στις μεμβράνες των ενδοσωμάτων ανιχνεύουν βακτηριακά και ιικά νουκλεϊκά οξέα. Η σχετική συνεισφορά κάθε TLR στην ενδογενή ανοσιακή απόκριση δεν είναι γνωστή, καθώς τα παθογόνα περιέχουν πολλούς προσδέτες ειδικούς για αρκετούς διαφορετικούς TLRs. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με κάθε TLR είναι διαφορετικά, αν και μοιράζονται κοινά συστατικά. Αν και στον άνθρωπο έχει βρεθεί το γονίδιο για τον TLR11, δεν μπορεί να κωδικοποιήσει για τη λειτουργική πρωτεΐνη, καθώς περιέχει κωδικόνια λήξης. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας έχει μελετηθεί κυρίως στον ποντικό. HSV-1, herpes simplex virus 1; RSV, Roux sarcoma virus; MMTV, mouse mammary tumor virus (O'Neill LA, 2004).

**Η υπο-ομάδα των προσαρμοστών:** Μετά την ενεργοποίηση, οι TIRs αλληλεπιδρούν με ειδικές πρωτεΐνες-προσαρμοστές που περιέχουν TIR επικράτεια. Πέντε τέτοιοι προσαρμοστές έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα: η μυελοειδής πρωτεΐνη διαφοροποίησης (MyD) 88 (Burns K et al., 1998; Wesche H et al., 1997), η όμοια με τον προσαρμοστή MyD88 (MyD88-adaptor-like, MAL)/ πρωτεΐνη που σχετίζεται με το TIR (TIR-associated protein, TIRAP) (Horng T et al., 2002; Horng T et al., 2001; Yamamoto M et al., 2002), η πρωτεΐνη-προσαρμοστής που περιέχει TIR και επάγει την IFN-β (TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFNβ, TRIF)/ μόριο που περιέχει περιοχή TIR (TIR-domain-containing molecule, TICAM) (Fitzgerald KA et al., 2003b; Sato S et al., 2003; Yamamoto M et al., 2003), το TRIF-σχετιζόμενο μόριο-προσαρμοστής (TRIF-related adaptor molecule, TRAM) και η πρωτεΐνη που περιέχει SAM και ARM περιοχές [sterile alpha motif (SAM) and Armadillo motif (ARM) domain-containing protein, SARM] (McGettrick AF and O'Neill LA, 2004). Οι TIRs χρησιμοποιούν διαφορετικούς συνδυασμούς των παραπάνω προσαρμοστών για να θέσουν σε λειτουργία κοινά και μοναδικά μονοπάτια, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των

μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και του τρίτου ρυθμιστικού παράγοντα της ιντερφερόνης (interferon regulatory factor, IRF3).

### 1.3.1.1 Μονοπάτια των TIRs

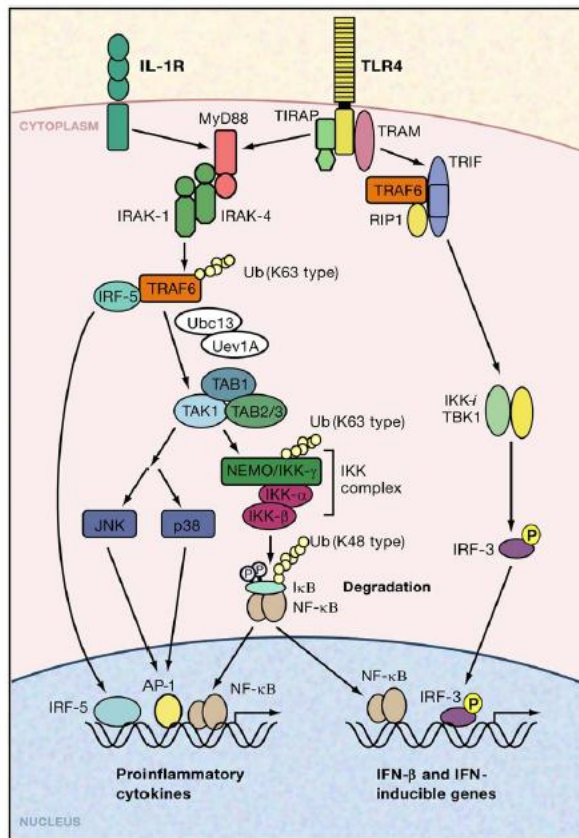
Οι TLRs και ο IL-1R μοιράζονται εν γένει κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια. Ενεργοποίηση από τους προσδέτες τους προσελκύει προσαρμοστές που περιέχουν TIR-περιοχές. Οι διαφορετικές αποκρίσεις που μεσολαβούνται από τους διαφορετικούς TIR-προσδέτες μπορούν εν μέρει να αποδοθούν στην επιλεκτική χρήση αυτών των μορίων-προσαρμοστών. Οι MyD88 και TRIF είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση διακριτών σηματοδοτικών μονοπατιών, που οδηγούν στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και IFNs τύπου I αντίστοιχα. Ο MyD88 είναι απαραίτητος για τη σηματοδότηση από τον IL-1R και όλους τους TLRs εκτός του TLR3. Εδώ θα εστιάσουμε στον IL-1RI (τον υποδοχέα της IL-1) και στον TLR4 [ο οποίος αναγνωρίζει LPS σε συνεργασία με την πρωτεΐνη που προσδένει στο LPS (LBP), το συν-υποδοχέα CD14 (Haziot A et al., 1996) και MD-2 (Nagai Y et al., 2002)] ως πρωτότυπα για κάθε υπο-οικογένεια (Εικόνα 20).

Ο όρος **Ιντερλευκίνη-1 (IL-1)** αναφέρεται σε μία ομάδα τριών πολυπεπτιδίων: στις IL-1α και IL-1β, που αποτελούν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, οι οποίες εμπλέκονται στην ανοσιακή άμυνα εναντίον μόλυνσης και στον IL-1Ra (ανταγωνιστή του IL-1R), που ανταγωνίζεται τις IL-1α και IL-1β για την πρόσδεση στον υποδοχέα.

#### 1.3.1.1.1 Το MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι

Το μονοπάτι της IL-1 (Εικόνα 20) αρχίζει με την προσέλκυση του MyD88 στο σύμπλοκο των IL-1RI/IL-1RAcP (βοηθητική πρωτεΐνη του IL-1R). Αξίζει να σημειωθεί ότι το παραπάνω σύμπλοκο σχηματίζεται μόνο παρουσία IL-1 και, όπως είναι αναμενόμενο, οι δύο TIR περιοχές στο κυτταροπλασματικό τμήμα των υποδοχέων προσεγγίζουν και δρουν ως σηματοδοτική πλατφόρμα για να «στρατολογηθεί» ο MyD88 (Dunne A and O'Neill LA, 2003). Κατόπιν, προσελκύονται οι IRAK4 (IL-1R-associated kinase, κινάση που σχετίζεται με τον IL-1R) και IRAK1 μέσω ομόφιλης αλληλεπίδρασης των περιοχών θανάτου (DDs) (Burns K et al., 2000; Wesche H et al., 1997; Zhang G and Ghosh S, 2002). Η IRAK1 αποτελείται από μία N-τελική DD (Cao Z et al., 1996a), την οποία ακολουθεί μία επικράτεια πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης, σερίνης και θρεονίνης (ProST τμήμα), μία περιοχή κινάσης σερίνης/θρεονίνης και μία C-τελική επικράτεια που περιέχει τρεις συναινετικές αλληλουχίες αλληλεπίδρασης με τον TRAF6 (TNFR-associated factor, TNFR-Σχετιζόμενος Παράγοντας) (Kollewe C et al., 2004; Lamothe B et al., 2007; Ye H et al., 2002). Ο TRAF6 είναι μέλος της οικογένειας των TRAFs (αναλύεται διεξοδικότερα στη συνέχεια) και περιέχει μία N-τελική RING (really interesting new gene, πολύ ενδιαφέρον νέο γονίδιο) περιοχή, πέντε δομές δακτύλου ψευδαργύρου και μία συντηρημένη C-τελική TRAF περιοχή, η οποία είναι και υπεύθυνη για τον ολιγομερισμό του TRAF6. Η RING περιοχή από την άλλη έχει ενεργότητα E3 λιγάσης ουβικιτίνης (Cao Z et al., 1996a; Jiang Z et al., 2002; Lye E et al., 2004; Qin J et al., 2004). Η IRAK4 ενεργοποιείται μέσω αυτοφωσφορυλίωσης (Cheng H et al., 2006) και η ενεργοποίησή της οδηγεί σε φωσφορυλίωση της IRAK1 και, άρα, σε πλήρη ενεργότητα κινάσης (Cao Z et al., 1996b). Εν συνεχεία, η IRAK1 υπερ-φωσφορυλιώνεται στο τμήμα ProST, πιθανότατα

μέσω αυτοφωσφορυλίωσης και, έτσι, αποδεσμεύεται από το MyD88, αλλά όχι και από τον TRAF6 (Cao Z et al., 1996a; Kollwe C et al., 2004).



**Εικόνα 20. Το σηματοδοτικό μονοπάτι των TLR4/IL-1R1.**

Οι TLRs και ο IL-1R μοιράζονται εν γένει κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια. Ενεργοποίηση από τους προσδέτες τους προσελκύει προσαρμοστές που περιέχουν TIR-περιοχές, συμπεριλαμβανομένων των MyD88 και TIRAP, στον υποδοχέα και επάγει το μετέπειτα σχηματισμό ενός συμπλόκου IRAKs, TRAF6 και IRF5. Ο TRAF6 δρα ως E3 λιγάση της ουβικιτίνης και καταλύει το σχηματισμό K63-συνδεόμενης αλυσίδας πολυουβικιτίνης στον ίδιο τον TRAF6 και στο NEMO (αναγκαίος τροποποιητής του NF-κB). Η ουβικιτίνωση ενεργοποιεί το TAK1 (πρωτεϊνική κινάση του ενεργοποιημένου TGFβ) σύμπλοκο, οδηγώντας στη φωσφορυλίωση του NEMO και την ενεργοποίηση του IKK (κινάση της IκB) συμπλόκου. Ο φωσφορυλιωμένος IκB υπόκειται σε K48-συνδεόμενη ουβικιτίνωση και αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Ο ελεύθερος NF-κB μεταβαίνει στον πυρήνα και κινητοποιεί την έκφραση γονιδίων προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Παράλληλα, ο TAK1 ενεργοποιεί τους καταρράκτες των MAP κινασών, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της AP-1 (πρωτεΐνη-ενεργοποιητής), η οποία είναι, επίσης, σημαντική για την επαγωγή των γονιδίων των κυτοκινών. Ο TLR4 πυροδοτεί το ανεξάρτητο από τη MyD88 και εξαρτώμενο από τον TRIF σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω του TRAM για να επάγει τις IFNs τύπου I. Ο TRIF ενεργοποιεί τους NF-κB και IRF3, οδηγώντας στην επαγωγή των γονιδίων των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και των IFNs τύπου I. Οι TRAF6 και RIP1 (πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα) επάγουν την ενεργοποίηση του NF-κB και οι TBK1 (κινάση που προσδέει στην



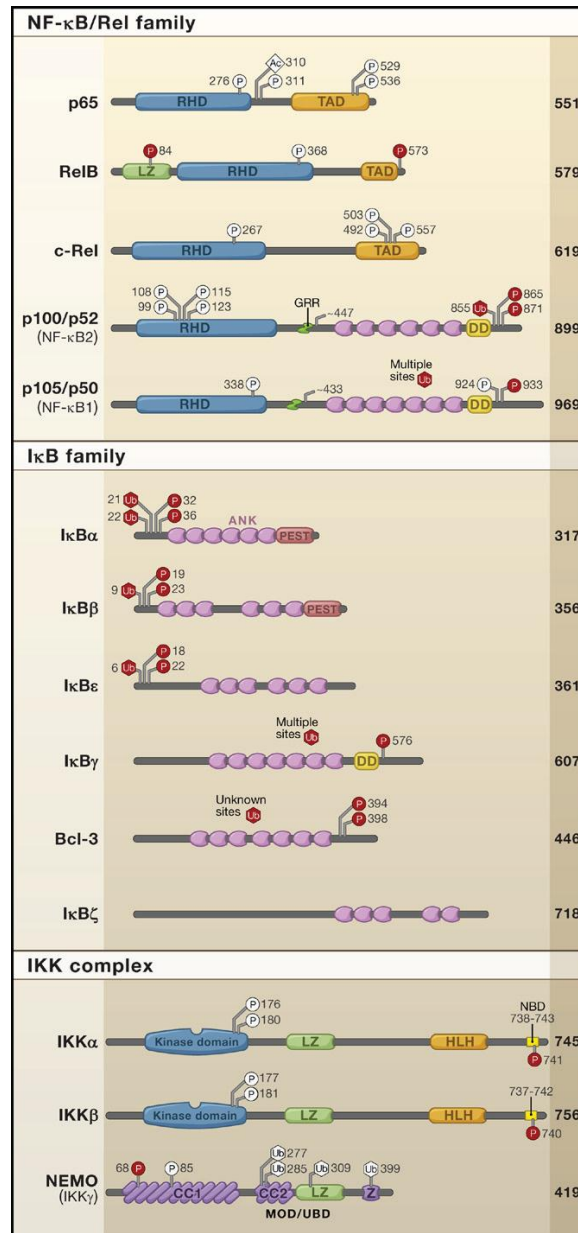
TANK)/IKK-ι φωσφορυλιώνουν τον IRF3 επάγοντας τη μετατόπισή του στον πυρήνα (Akira S et al., 2006).

Μετά την αποδέσμευση από το σύμπλοκο του υποδοχέα, το σύμπλοκο των IRAK1-TRAF6 αλληλεπιδρά με ένα προϋπάρχον TAK1 (TGFβ-activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση του ενεργοποιημένου TGFβ)-TAB1 (TAK1-binding protein, πρωτεΐνη που προσδένει στην TAK1)-TAB2 (ή TAB3) προσδεδεμένο στη μεμβράνη σύμπλοκο (Jiang Z et al., 2002). Το σύμπλοκο των TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2/3 μεταβαίνει στο κυτταρόπλασμα, ενώ η IRAK1 μένει στη μεμβράνη και πολυουβικιτινώνεται (Jiang Z et al., 2002; Li X et al., 1999; Qian Y et al., 2001; Yamin TT and Miller DK, 1997). Η ακριβής λειτουργία της πολυουβικιτινωσης της IRAK1 δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη (Butler MP et al., 2007; Li X et al., 1999; Ordureau A et al., 2008; Qian Y et al., 2001; Schaubliege R et al., 2006; Schaubliege R et al., 2007; Strelow A et al., 2003; Windheim M et al., 2008; Yamin TT and Miller DK, 1997).

Στο κυτταρόπλασμα, ο TRAF6 αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο Uev1A (ubiquitin-conjugating enzyme E2, E2 ένζυμο σύζευξης ουβικιτίνης, παραλλαγή 1)/ Ubc13 (ubiquitin-conjugating enzyme, ένζυμο σύζευξης ουβικιτίνης 13), πολυουβικιτινώνεται και ολιγομερίζεται (Chen ZJ, 2005; Deng L et al., 2000). Ο ολιγομερισμός του TRAF6 φαίνεται να οδηγεί στην αυτό-πολυουβικιτινωσή του, η οποία είναι απαραίτητη για την IL-1- και την LPS-επαγόμενη NF-κΒ και JNK (c-jun N-τελική κινάση) ενεργοποίηση (Deng L et al., 2000; Fukushima T et al., 2007; Lamothe B et al., 2007; Naito A et al., 1999; Wang C et al., 2001). Επιπρόσθετα, οι TAB2, TAB3 και IKKγ (IκB kinase, κινάση της IκB)/NEMO (NF-κΒ essential modulator, αναγκαίος τροποποιητής του NF-κΒ) K63-πολυουβικιτινώνονται από τον TRAF6 (Andersen PL et al., 2005; Ishitani T et al., 2003; Kanayama A et al., 2004; Lamothe B et al., 2007; Sun L et al., 2004).

Οι TAB1, TAB2 και TAB3 αποτελούν προσαρμοστές της TAK1 (Cheung PCF et al., 2004; Ishitani T et al., 2003). Ωστόσο, ο ρόλος της TAB1 στο μονοπάτι της IL-1 δεν είναι ξεκάθαρος (Bertelsen M and Sanfridson A, 2007; Mendoza H et al., 2008; Shim JH et al., 2005). Οι TAB2 και TAB3 περιέχουν μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου που αλληλεπιδρούν με αλυσίδες K63-πολύ-ουβικιτίνης (Ninomiya-Tsuji J et al., 1999). Για αυτό, έχει προταθεί ότι οι TAB2 και TAB3 λειτουργούν ως πρωτεΐνες-προσαρμοστές που συνδέουν τον TRAF6 με την TAK1 (Ishitani T et al., 2003; Takaesu G et al., 2000). Η TAK1 ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση των TAB2 ή TAB3 στις αλυσίδες πολύ-ουβικιτίνης (Kanayama A et al., 2004; Wang C et al., 2001). Στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την IKKβ και τη MKK6 (MAPK kinase, κινάση MAPK), οι οποίες ρυθμίζουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ και των MAPKs (mitogen signal-regulated protein kinases, πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από μιτογόνα σήματα), καταλήγοντας στην επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στις αποκρίσεις στη φλεγμονή.

Λεπτομερέστερα (**Εικόνα 21**), το IKK σύμπλοκο αποτελείται από τρεις υπομονάδες: τη ρυθμιστική IKKγ/NEMO (Cohen L et al., 1998; Rothwarf DM et al., 1998; Yamaoka S et al., 1998) και τις καταλυτικές IKKα και β (Rothwarf DM et al., 1998; Rottenberg S et al., 2002; Verma IM et al., 1995). Ο NEMO είναι απαραίτητος για τη συγκρότηση των IKKs (Li XH et al., 2001). Επιπλέον, συνδέει τις IKKs με την IκB (αναστολέας της κΒ) (Yamamoto Y et al., 2001). Οι κινάσες του παραπάνω συμπλόκου μπορούν να φωσφορυλιώσουν την IκBα στις σερίνες 32 και 36 (Lee FS et al., 1998). Η IKKβ χρειάζεται για την ενεργοποίηση του NF-κΒ και δεν μπορεί να αντικατασταθεί από την IKKα (Li Q et al., 1999). Το TAK1 σύμπλοκο συνδέεται και με τη MKK6 και άλλες κινάσες των MAPKs, όπως τη MKK3 και τη MKK7.



**Εικόνα 21. Οι οικογένειες πρωτεϊνών των NF-κB, IκB και IKK.**

Απεικονίζονται τα μέλη των NF-κB, IκB και IKK πρωτεϊνών. Ο αριθμός των αμινοξέων σε κάθε ανθρώπινη πρωτεΐνη αναγράφεται δεξιά. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν την ενεργότητα των IKKs ή τη μεταγραφική ενεργοποίηση απεικονίζονται με P, U ή Ac για φωσφορυλίωση, ουβικιτίνωση ή ακετυλίωση, αντίστοιχα. Ανασταλτικά γεγονότα και οι θέσεις φωσφορυλίωσης και ουβικιτίνωσης στις p100, p105 και IκB, που οδηγούν στην αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα, συμβολίζονται με κόκκινο Ps και Us, αντίστοιχα. RHD: περιοχή ομολογίας με τη Rel; TAD: Περιοχή Ετερόπλευρης Ενεργοποίησης; LZ: περιοχή φερμουάρ λευκίνης; GRR: τμήμα πλούσιο σε γλυκίνη; HLH: helix περιοχή έλικας-θηλειάς-έλικας; Z: περιοχή δάκτυλου ψευδαργύρου; CC1/2: περιοχές coiled-coil; NBD: περιοχή πρόσδεσης NEMO; MOD/UBD: ελάχιστη περιοχή ολιγομερισμού και περιοχή πρόσδεσης ουβικιτίνης (Hayden MS and Ghosh S, 2008).

Οι MAPKs είναι Ser/Thr κινάσες και αποτελούνται από τις JNKs/SAPKs (stress-activated protein kinase, στρες-ενεργοποιούμενη πρωτεϊνική κινάση), ERK (extracellular signal-regulated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση που ρυθμίζεται από εξωκυττάρια σήματα) και p38 (Chang and Karin, 2001). Η φωσφορυλίωση της MKK6 οδηγεί σε ενεργοποίηση της JNK ενώ οι MKK3 και 7 είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της p38. Οι JNK και p38 καταλήγουν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AP-1, που συμμετέχει στην επαγωγή γονιδίων απόκρισης στη φλεγμονή (Karin, 1996). Εάν και είναι γνωστό ότι ο NF-κB προωθεί την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις και στην προστασία από την απόπτωση (Beg and Baltimore, 1996), η ενεργοποίηση της AP-1 από τις MAPKs μπορεί να «αφυπνίζει» αποκρίσεις σε συνθήκες στρες και να προωθεί τόσο την κυτταρική επιβίωση όσο και τον κυτταρικό θάνατο (Shaulian and Karin, 2001). Εκτός από τον NF-κB, ο μεταγραφικός παράγοντας IRF5 ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων των κυτοκινών (Takaoka et al., 2005). Μετά την ενεργοποίηση με τον προσδέτη του TIR, ο IRF5 μεταβαίνει στον πυρήνα και προσδένει σε πιθανά μοτίβα ISRE (IFN-stimulated response element, στοιχείο απόκρισης στην ενεργοποίηση με IFN) που βρίσκονται στις περιοχές του υποκινητή των γονιδίων των κυτοκινών. Η IκBζ, μία πρωτεΐνη που μοιάζει με την IκB, είναι επίσης αναγκαία για την επαγωγή μίας ομάδας γονιδίων που ενεργοποιείται κατά τη σηματοδότηση από τους TIRs (Yamamoto M et al., 2004). Επάγεται άμεσα μετά την κινητοποίηση με τους TLR-προσδέτες, αλλά όχι με τον TNF, και ενεργοποιεί τις IL-6, IL-12 και άλλα φλεγμονώδη γονίδια μετά τη σύνδεσή της με την p50 υπομονάδα του NF-κB. Εάν και οι TLR4 και IL-1RI έχουν συγγενική ενδοκυττάρια περιοχή TIR που κινητοποιεί το μονοπάτι, ο TLR4 προσθέτει κάποια ιδιαιτερότητα (**Εικόνα 22**). Σε αντίθεση με το σύμπλοκο του IL-1RI, η προσέλευση του MyD88 στον TLR4 εξαρτάται από την TIRAP/MAL (Horng T et al., 2002; Yamamoto M et al., 2002). Επίσης, ένα MyD88-ανεξάρτητο σηματοδοτικό μονοπάτι ξεκινάει από τον TLR4.

Το LPS αποτελεί ένα από τα πλέον μελετημένα ανοσορυθμιστικά συστατικά των βακτηρίων και μπορεί να επάγει σωματική φλεγμονή και σήψη. Το σημαντικό αυτό δομικό συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων αποτελείται από τρία τμήματα: το λιπίδιο A, τον κεντρικό ολιγοσακχαρίτη και μία O πλευρική αλυσίδα.

### 1.3.1.1.2 Το MyD88-ανεξάρτητο μονοπάτι

Πρόσφατα, δείχτηκε ότι ο TLR4 κινητοποιεί τη σηματοδότηση από δύο τοποθεσίες (Kagan JC et al.). Στην πλασματική μεμβράνη προσελκύει τους MAL και MyD88, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Φαίνεται ότι στη συνέχεια μεταβαίνει στο ενδόσωμα, όπου «στρατολογεί» δύο άλλους προσαρμοστές με TIR περιοχή, τους TRAM και TRIF (**Εικόνα 20**). Μελέτες σε μακροφάγα που δεν έχουν TRIF αποδεικνύουν ότι το μόριο αυτό διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 και στην τελικής φάσης ενεργοποίηση των NF-κB και MAPK. Επιπροσθέτως, η εξάλειψη και του MyD88 και του TRIF οδηγεί σε εξαιρετικά μειωμένη ενεργοποίηση των NF-κB και MAPK (Covert MW et al., 2005; Yamamoto M et al., 2003). Η C-τελική περιοχή του TRIF, που περιέχει ένα μοτίβο ομοτυπικής αλληλεπίδρασης με τη RIP (RHIM), συντελεί στην αλληλεπίδραση με τη RIP1 (πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα).



Αρχικά, η RIP1 ταυτοποιήθηκε ως μία κινάση σερίνης/θρεονίνης, απαραίτητη για την TLR-επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-κΒ (Cusson-Hermance N et al., 2005; Meylan E et al., 2004). Ωστόσο, φαίνεται ότι η RIP1 δεν είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του IRF3 που κινητοποιείται από LPS. Συγκεκριμένα, πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν ότι ο TRIF προσελκύει τον TRAF3 για να ενεργοποιήσει τον IRF3 (Hacker H et al., 2006; Oganessian G et al., 2006). Ο TRAF3, εν συνεχεία, μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις TANK (TRAF family member-associated NF-κΒ activator, ενεργοποιητής του NF-κΒ που σχετίζεται με μέλη της TRAF οικογένειας), TBK1 (TANK-binding protein, κινάση που προσδέει στην TANK) και IKKι (IKKε), για να μεσολαβήσει την καταρροϊκή σηματοδότηση (Guo B and Cheng G, 2007; Oganessian G et al., 2006). Οι TBK1 και IKKι είναι σημαντικές για το διμερισμό και την πυρηνική μεταβίβαση του IRF3 (Fitzgerald KA et al., 2003a; Hemmi H et al., 2004). Ο IRF3, μαζί με τον NF-κΒ, ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων στόχων, όπως οι Τύπου Ι ιντερφερόνες (Honda K and Taniguchi T, 2006; Moynagh PN, 2005). Η επαγωγή των γονιδίων των ιντερφερόνων Τύπου Ι και των επαγόμενων από τις ιντερφερόνες γονιδίων συντελεί στις αντι-ιικές και αντι-βακτηριακές αποκρίσεις (Bowie AG and Haga IR, 2005; Perry AK et al., 2005).

**TRAF6:** Η οικογένεια των TRAFs φαίνεται να αποτελεί σχετικά πρόσφατη εξελικτική ανάπτυξη, καθώς υπάρχει μόνο μία στο *C. elegans*, δύο στη *Drosophila* και επτά στα θηλαστικά (Xu LG et al., 2004). Οι TRAFs αποτελούνται από μία αμινοτελική περιοχή πρόσδεσης ψευδαργύρου (zinc-binding domain), που στην ουσία είναι ένας δάκτυλος RING ακολουθούμενος από αρκετούς δακτύλους ψευδαργύρου και μια καρβοξυτελική TRAF περιοχή περίπου 150 αμινοξέων, που αποτελείται από μία coiled-coil περιοχή (γνωστή και ως TRAF-N περιοχή) και μία υψηλά συντηρημένη TRAF-C περιοχή (Park YC et al., 1999; Rothe M et al., 1994). Η N-τελική περιοχή είναι ουσιώδης για την ενεργοποίηση καταρροϊκών σηματοδοτικών καταρρακτών και απάλειψή της καθιστά το μόριο επικρατές αρνητικό για τη σηματοδότηση (Takeuchi et al., 1996). Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η C-τελική TRAF περιοχή υιοθετεί ένα σχήμα που μοιάζει με μανιτάρι με την coiled-coil TRAF-N περιοχή να αποτελεί το «μίσχο» και την TRAF-C την «κεφαλή» (Park et al., 1999). Αυτή η TRAF περιοχή επιτρέπει την αυτοσυγκρότηση και τις αλληλεπιδράσεις με τους υποδοχείς και άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες.

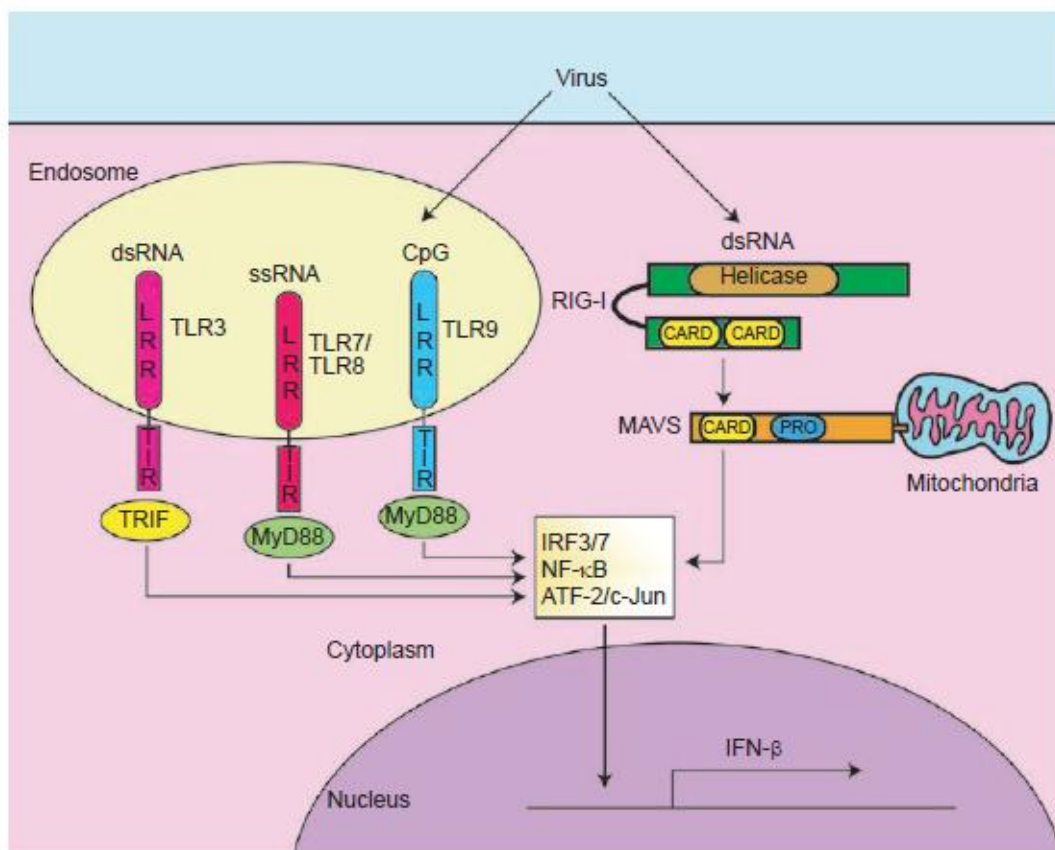
Όλοι οι TRAFs των θηλαστικών εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, εκτός του TRAF4, που βρίσκεται στον πυρήνα και αποτελούν σημαντικούς μεταγωγείς σήματος για την υπεροικογένεια των TNFRs (Bradley J and Pober JS, 2001; Chung J et al., 2002; Wajant H et al., 2001). Συνδυάζοντας την ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων με καταρροϊκά σηματοδοτικά γεγονότα που καταλήγουν στη ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής, οι TRAFs ασκούν απολύτως απαραίτητες λειτουργίες σε ένα μεγάλο εύρος φυσιολογικών και παθολογικών διαδικασιών, κυρίως σε ποικίλες μορφές φυσικής και προσαρμοζόμενης ανοσίας, φλεγμονής και ομοίωστασης των ιστών.

Ο TRAF6 αποτελεί ένα μοναδικό μέλος της TRAF οικογένειας, καθώς αναλύσεις εξέλιξης έδειξαν ότι είναι ένας από τους πλέον αποκλίνοντες TRAFs, τόσο στην ομολογία της αλληλουχίας της TRAF-C περιοχής όσο και στη δομή του γονιδίου του (Chung J et al., 2002). Η μοναδική βιολογική λειτουργία του TRAF6 είναι στην ουσία προϊόν της διακεκριμένης ειδικότητάς του για αναρροϊκούς υποδοχείς και σηματοδοτικές πρωτεΐνες, η οποία καθορίζεται από τη μοναδική του TRAF-C περιοχή. Ενώ οι TRAF1, TRAF2, TRAF3, και TRAF5 παρουσιάζουν παρόμοια ειδικότητα πρόσδεσης στους TNFRs (Arch RH et al., 1998), ο TRAF6 αναγνωρίζει εντελώς διαφορετικές

θέσεις πρόσδεσης στα μέλη της TNFR υπερικογένειας, όπως στους CD40 και RANK (receptor activator of NF- $\kappa$ B, υποδοχέας-ενεργοποιητής του NF- $\kappa$ B) (Darnay BG et al., 1999; Pullen SS et al., 1998). Δομικές μελέτες του TRAF6 σε σύμπλοκο με CD40 και RANK πεπτίδια αποκάλυψαν εντυπωσιακές διαφορές στην αναγνώριση του υποδοχέα από τον TRAF6 και τον TRAF2 (Ye H et al., 2002). Ευθυγράμμιση αλληλουχιών βασιζόμενη στη δομή υποδεικνύει ότι ο TRAF6 αναγνωρίζει ένα συντηρημένο μοτίβο P-X-E-X-X-(αρωματικό/όξινο κατάλοιπο). Επιπλέον, ο TRAF6 συμμετέχει και στα μονοπάτια της υπερικογένειας IL-1R/TLR (Martin MU and Wesche H, 2002; O'Neill L, 2002). Περαιτέρω επιθεώρηση της αλληλουχίας έδειξε ότι οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες IRAK1 (Cao Z et al., 1996a), IRAK2 (Muzio M et al., 1997) και IRAK4 (Wesche H et al., 1999) των παραπάνω μονοπατιών περιέχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα του μοτίβου πρόσδεσης του TRAF6, παρέχοντας μία δομική βάση για τη συμμετοχή του σε αυτά τα μονοπάτια. Η IRAK4, η πλέον πρόσφατα χαρακτηρισμένη IRAK πρωτεΐνη (Li S et al., 2002), δε φαίνεται να έχει μοτίβα πρόσδεσης του TRAF6, υποδηλώνοντας ότι αλληλεπιδρά με τον TRAF6 έμμεσα, πιθανότατα μέσω ετερο-ολιγομερισμού με άλλες IRAKs. Επιπροσθέτως, ο TRAF6 μπορεί να ενεργοποιήσει την οικογένεια των Src μη-υποδοχέων κινασών τυροσίνης, όπως την c-Src (Wong BR et al., 1999), προσδίδοντας επιπλέον ποικιλία στη σηματοδότηση από τον TRAF6. Ανάλυση TRAF6<sup>-/-</sup> ποντικών έδειξε ότι ο παράγοντας αυτός είναι απαραίτητος τόσο για την περιγενετική όσο και για τη μεταγενετική επιβίωση. Επίσης, οι ποντικοί αυτοί παρουσιάζουν οστεοπέτρωση. Επιπρόσθετα, κύτταρα με ανεπάρκεια TRAF6 εκδηλώνουν ελαττωματικές αποκρίσεις στη σηματοδότηση των IL-1, LPS και CD40 (Lomaga MA et al., 1999).

### 1.3.2 Μονοπάτια αντι-ικκής φυσικής ανοσίας

Οι ιοί είναι ιδιαίτερα μολυσματικά παθογόνα που βασίζονται σε μηχανισμούς του κυττάρου-ξενιστή για επιβίωση και αντιγραφή. Οι περισσότερες ικές μολύνσεις αντιμετωπίζονται αποτελεσματικά από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Ιδιαίτερη συμβολή στην αντι-ική φυσική ανοσιακή απόκριση έχει η σύνθεση και έκκριση των ιντερφερονών (IFN) τύπου I, όπως είναι οι IFN $\alpha$  και IFN $\beta$ , οι οποίες εκδηλώνουν αντι-ικές, αντι-πολλαπλασιαστικές και ανοσορυθμιστικές λειτουργίες (Honda K et al., 2005b). Προκειμένου να κινητοποιηθεί μία αποτελεσματική φυσική αντι-ική ανοσιακή απόκριση απαιτείται: α) ανίχνευση του ιού-εισβολέα από τους υποδοχείς του ανοσοποιητικού συστήματος και β) έναρξη των πρωτεϊνικών σηματοδοτικών καταρρακτών που ρυθμίζουν τη σύνθεση των IFNs.



**Εικόνα 22. TLR και RIG-1: δύο αντι-ικικά μονοπάτια ενδογενούς ανοσίας.**

Οι TLR3, TLR7, TLR8 και TLR9 έχουν μία διαμεμβρανική περιοχή και αναγνωρίζουν τους προσδέτες τους μέσω των LRRs στις περιοχές που βρίσκονται στον αυλό. Η κυτταροπλασματική TIR περιοχή αυτών των υποδοχέων καθιστά δυνατή την προσέλκυση προσαρμογέων, όπως των TRIF ή MyD88 που σηματοδοτούν στους καταρροϊκούς μεταγραφικούς παράγοντες ATF-2 (μεταγραφικός παράγοντας-ενεργοποιητής)/c-Jun, NF-κB και IRF. Η RIG-1 αποτελεί υποδοχέα για το ενδοκυττάριο dsRNA. Η C-τελική περιοχή ελικάσης της RIG-1 δένει σε dsRNA και ενεργοποιεί τις N-τελικές CARD περιοχές, έτσι ώστε να ξεκινήσει ο καταρροϊκός σηματοδοτικός καταρράκτης. Η MAVS (μιτοχονδριακή πρωτεΐνη αντι-ικής σηματοδότησης) είναι μία μιτοχονδριακή πρωτεΐνη που συμμετέχει στο αντι-ικό μονοπάτι καταρροϊκά της RIG-1. Η ενεργοποίηση οποιουδήποτε μονοπατιού οδηγεί στην επαγωγή της IFNβ (Seth RB et al., 2006).

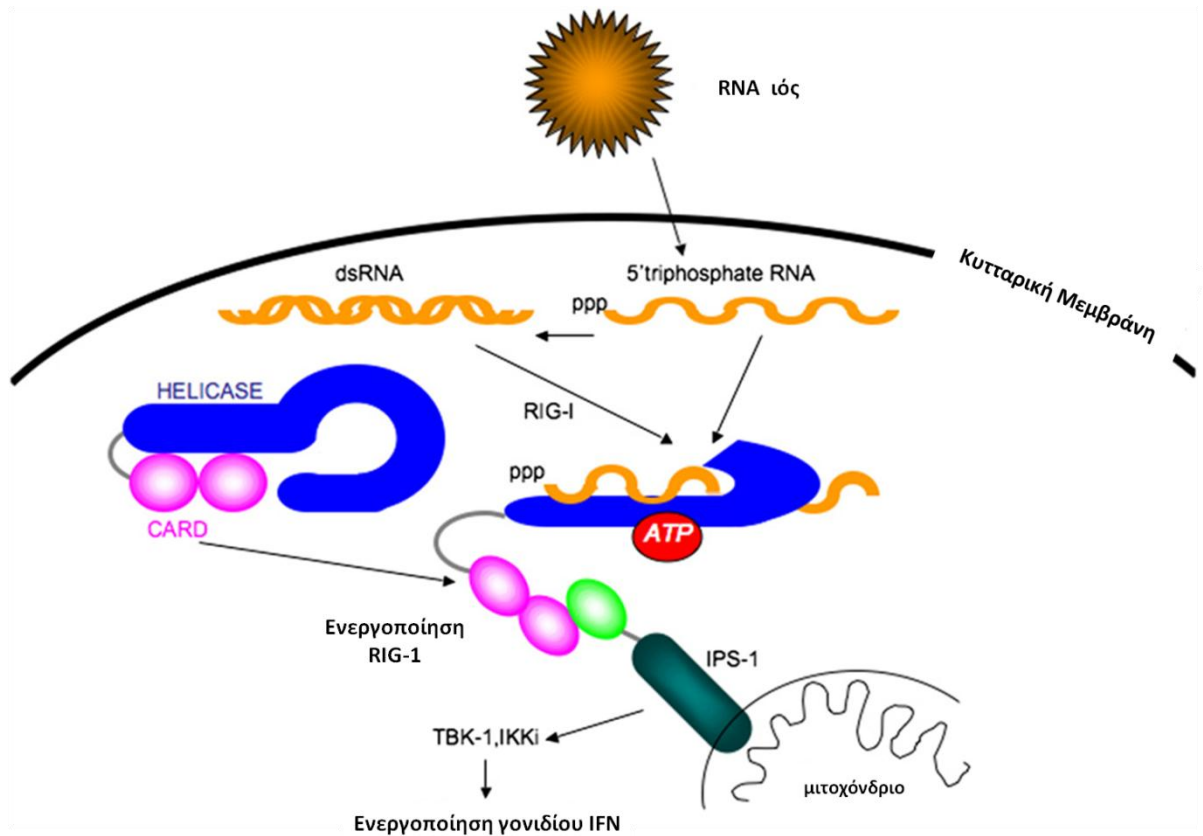
### 1.3.2.1 Ανίχνευση του ιικού εισβολέα

Υπάρχουν δύο συστήματα υποδοχέα σε θέση να ανιχνεύσουν την παρουσία ιού και να οργανώσουν την ανοσιακή απόκριση (**Εικόνα 22**). Τα συστήματα αυτά εντοπίζονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα και αναγνωρίζουν διαφορετικούς προσδέτες. Οι TLRs 3, 7, 8 και 9 αναγνωρίζουν διακριτούς τύπους ιικά-προερχόμενων νουκλεϊκών οξέων, όμως από τη στιγμή που όλοι οι TLRs εντοπίζονται σε μεμβράνες, δεν μπορούν να ανιχνεύσουν ιούς όπως το Newcastle disease virus (NDV) ή το Sendai virus (SV) που εισέρχονται άμεσα στο κυτταρόπλασμα ή dsRNA που συντίθεται κατά την ενεργή ιική αντιγραφή (**Εικόνα 22**). Δύο κυτταροπλασματικές CARD ελικάσες, οι RIG-1 και MDA5, θεωρείται ότι ανιχνεύουν τέτοιους ιούς (Andrejeva J et al.,

2004; Yoneyama M et al., 2004). Συγκεκριμένα, η RIG-1 είναι μία επαγώγιμη από την IFN πρωτεΐνη που περιέχει CARDs και μία περιοχή ελικάσης DExD/H box (Yoneyama M et al., 2004). Η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για την αναγνώριση μίας σειράς ssRNA ιών, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται οι paramyxoviruses, ο ιός της γρίπης, ο Vesicular stomatitis virus (VSV) και ο Japanese encephalitis virus (JEV) (Yoneyama M et al., 2004). Από την άλλη η MDA5 συμμετέχει στην αναγνώριση άλλων RNA ιών, συμπεριλαμβανομένων των picornaviruses [π.χ. Encephalomyocarditis virus (EMCV), Mengo virus και Theiler's virus] (Gitlin L et al., 2006; Kato H et al., 2005; Kato H et al., 2006). Επίσης, η MDA5 και όχι η RIG-1, είναι εκείνη που συμμετέχει στην αναγνώριση του πολυΙ:C (Gitlin L et al., 2006; Kato H et al., 2006). Οι MDA5 και RIG-1 παρουσιάζουν 23% και 35% ταυτότητα αμινοξέων στις επικράτειες CARD και ελικάσης αντίστοιχα (Yoneyama M et al., 2005). Τέλος, η πρωτεΐνη LGP2 παρουσιάζει 31% και 41% ταυτότητα με τις περιοχές RNA ελικάσης των RIG-1 και, αλλά δεν έχει CARD (Rothenfusser S et al., 2005; Yoneyama M et al., 2005). Έχει προταθεί, λοιπόν, ότι η LGP2 δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής της RIG-I/MDA-5 σηματοδότησης.

**Σηματοδοτικά μονοπάτια των ελικάσων που μοιάζουν με τη RIG-1:** Το 2005 απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε από αρκετά εργαστήρια μια πρωτεΐνη-προσαρμοστής αποτελούμενη από μία αμινοτελική CARD περιοχή που θυμίζει αυτή των MDA-5 ή RIG-I και η οποία ονομάστηκε IPS-1 (ενεργοποιητής του υποκινητή της IFN $\beta$ ), MAVS (μιτοχονδριακή πρωτεΐνη αντι-ικκής σηματοδότησης), VISA (ικά-επαγόμενος σηματοδοτικός προσαρμοστής) ή CARDIF (Kawai T et al., 2005; Meylan E et al., 2005; Seth RB et al., 2005; Xu LG et al., 2005). Η πρωτεΐνη αυτή, όταν εκφράζεται σε ανθρώπινα κύτταρα, έχει την ικανότητα να επάγει την ενεργοποίηση του υποκινητή της IFN τύπου I, καθώς και του NF- $\kappa$ B. Η IPS-1 συνδέεται με τη RIG-1 ή τη MDA5 μέσω των CARD περιοχών, δρα ως προσαρμοστής για τις RIG-1 και MDA5 και κατέχει ουσιαστικό ρόλο στη σηματοδότηση αυτών των μονοπατιών (Seth RB et al., 2005). Καταρροϊκά των RIG-1-IPS-1, οι TBK1 και IKK $\alpha$  ενεργοποιούνται για να φωσφορυλιώσουν τους IRF3 και IRF7, υποδεικνύοντας ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εκκινούνται από την ενεργοποίηση των TLRs και RIG-1 μπορεί να συγκλίνουν στο επίπεδο των TBK1/IKK $\alpha$  (**Εικόνες 20, 23 και 24**). Πάντως, δε φαίνεται να υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ της IPS-1 και των TBK1/IKK $\alpha$ . Ο TRAF3 δένει τόσο στην IPS-1 όσο και στις TBK1/IKK $\alpha$ , ενώ η απουσία του οδηγεί σε μειωμένη ιική επαγωγή των IFNs τύπου I. Φαίνεται, λοιπόν, ότι ο TRAF3 αποτελεί έναν κρίκο ανάμεσα στην IPS-1 και τις TBK1/IKK $\alpha$  (Saha SK et al., 2006).

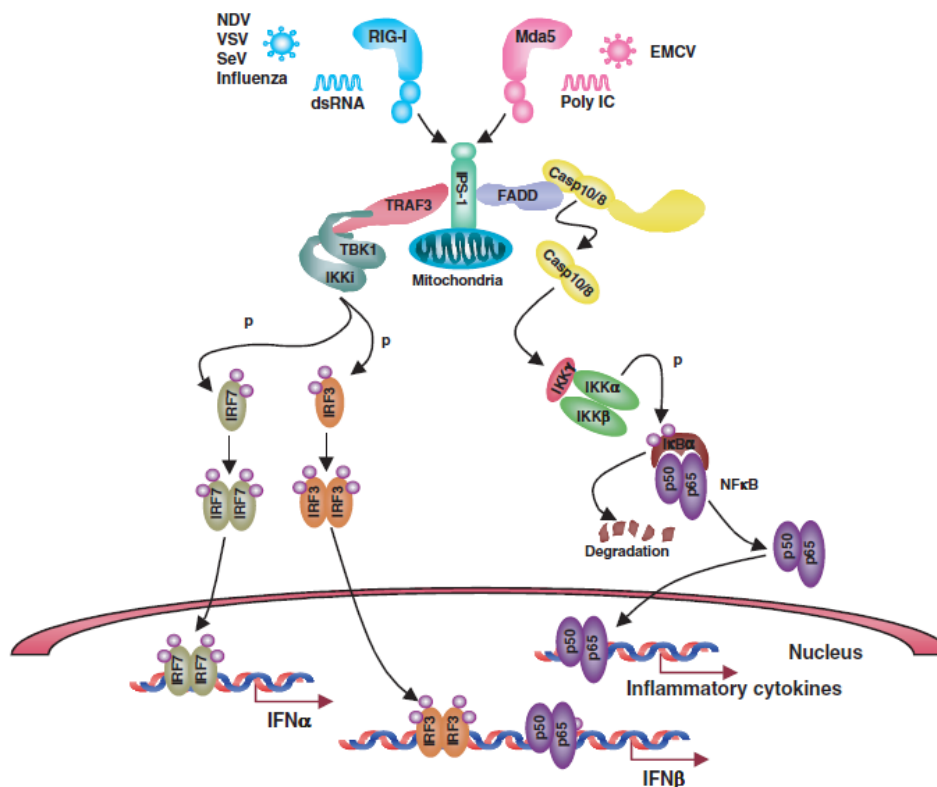
Η IPS-1 αλληλεπιδρά, επίσης, με τη FADD (Fas-σχετιζόμενη πρωτεΐνη με περιοχή θανάτου), έναν προσαρμοστή που διαθέτει περιοχή θανάτου και εμπλέκεται στη σηματοδότηση των υποδοχών θανάτου (Kawai T et al., 2005). Κύτταρα με ανεπάρκεια FADD παρουσιάζουν εξασθενημένη επαγωγή IFN $\beta$  και φλεγμονωδών κυτοκινών. Η FADD σχηματίζει σύμπλοκο με τις κασπάσες-10 και -8, οι οποίες διασπώνται μετά την επίδραση πολυΙ:C στο κύτταρο (Balachandran S et al., 2004; Takahashi K et al., 2006). Τα διασπασμένα τμήματα των κασπασών αυτών (τα οποία περιέχουν μία περιοχή τελεστή θανάτου) είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τον NF- $\kappa$ B. Κύτταρα στα οποία απουσιάζει η κασπάση-8 εκδηλώνουν μειωμένη ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B και περιορισμένη επαγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών, ενώ η επαγωγή IFN τύπου I παραμένει ανεπηρέαστη. Οπότε, οι κασπάσες-8 και -10 εμπλέκονται ειδικά στην ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B καταρροϊκά της FADD. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα.



### Εικόνα 23. Ενεργοποίηση της RIG-1 από ιικό RNA στο κυτταρόπλασμα.

Φυσιολογικά, η RIG-1 σχηματίζει μία «κλειστή» δομή, στην οποία η CARD είναι καλυμμένη. Μετά την πρόσδεση σε ιικό RNA (dsRNA ή 5'-pppRNA) και ATP, η RIG-1 αλλάζει ενεργά τη στερεοδομή της και εκθέτει την CARD. Η CARD της RIG-1 αλληλεπιδρά ειδικά με έναν προσαρμοστή που περιέχει, επίσης, CARD, την IPS-1, η οποία εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η IPS-1 ενεργοποιεί τις ρυθμιστικές κινάσες TBK-1 and IKKε, προκειμένου να επάγουν την έκφραση των γονιδίων της IFN (Fujita T et al., 2007).

Η IPS-1 περιέχει μία διαμεμβρανική περιοχή πλούσια σε υδρόφοβα κατάλοιπα στο C-τελικό της άκρο και στοχεύει την πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια (Seth RB et al., 2005). Αξίζει να σημειωθεί ότι η διατήρηση της IPS-1 στα μιτοχόνδρια είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των IRF3, IRF7 και NF-κB, υποδηλώνοντας ότι τα μιτοχόνδρια ενδέχεται να είναι σημαντικά για τις αποκρίσεις IFN, πέρα από το ρόλο που κατέχουν στο μεταβολισμό και στον κυτταρικό θάνατο (Li XD et al., 2005; Lin R et al., 2006; Loo YM et al., 2006; Meylan E et al., 2005; Seth et al., 2005).



Εικόνα 24. Σηματοδοτικό μονοπάτι ελικασών που μοιάζουν με τη RIG-1 (Kawai T and Akira S, 2007a).

### 1.3.2.2 Ιντερφερόνη (IFN)

Οι ιντερφερόνες ανακαλύφθηκαν το 1957 ως συστατικό των μολυσμένων με ιό κυττάρων (ISAACS A and LINDENMANN J, 1957) και μαζί με τους υποδοχείς τους αποτελούν μία υπο-ομάδα της τάξης 2 των κυτοκινών με α-έλικα οι οποίες εμφανίστηκαν στα πρώιμα χορδωτά περίπου 500 εκατομμύρια χρόνια πριν (Krause CD and Pestka S, 2005). Οι IFNs συνιστούν μία οικογένεια κυτοκινών με αντι-ιικές, αντι-πολλαπλασιαστικές και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες (Boehm U et al., 1997; Kalvakolanu DV, 2000; Kotenko SV et al., 2003; Stark, 1998; Takemoto Y et al., 2004). Στην παρούσα εργασία μας απασχόλησαν οι IFNs τύπου I και πιο συγκεκριμένα η IFNβ, αξίζει, ωστόσο, να αναφερθούμε συνοπτικά στην ταξινόμηση και στις γενικές ιδιότητες των ιντερφερονών.

**Ταξινόμηση και ιδιότητες των ιντερφερονών:** Ταξινομούνται σε τρεις κύριες ομάδες, τους τύπους I, II και III. Η ταξινόμηση αυτή βασίζεται στη δομική ομολογία, την πρόσδεση σε υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας και τη λειτουργική ενεργότητα.

Οι τύπου I IFNs (Roberts RM et al., 1998) αποτελούνται από τις IFNα, β, ω, ε (Langer JA et al., 2004; Pestka S et al., 2004) και κ (LaFleur DW et al., 2001). Επιπλέον, οι IFNδ (Lefevre F et al., 1998), τ (Roberts RM et al., 1999) και ζ (limitin) (Oritani K et al., 2000) συμπεριλαμβάνονται σε αυτή την ομάδα, εάν και ανιχνεύονται μόνο στους χοίρους/βοοειδή, στα μηρυκαστικά και στους ποντικούς αντίστοιχα. Η IFNγ αποτελεί τη μοναδική IFN τύπου II (Bach EA et al., 1997; Ikeda H et

al., 2002) και το γονίδιο της στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12. Πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν οι IFNλ1, IFNλ2 και IFNλ3 (γνωστές και ως IL-29, IL-28A και IL-28B αντίστοιχα) (Kotenko SV et al., 2003; Sheppard P et al., 2003). Αυτές οι IFNs συνθέτουν την τρίτη ομάδα: τις IFNs τύπου III. Οι τελευταίες έχουν χαρτογραφηθεί στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 19 (Pestka S et al., 2004; Takaoka A and Yanai H, 2006).

Σύμφωνα με τις μελέτες η IFNα είναι ενεργή ως μονομερές, ενώ η IFNβ ως διμερές (Kempner ES and Pestka S, 1986; Vilcek J, 2003). Όσο για την IFNγ, φαίνεται να λειτουργεί ως τετραμερές (Kempner ES and Pestka S, 1986; Langer JA et al., 1994; Vilcek J, 2003). Λίγα είναι μέχρι στιγμής γνωστά για τη δομή της IFNλ και για το πώς προσδένει στον υποδοχέα της. Οι παραπάνω δομικές και λειτουργικές διαφορές είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη όταν εξετάζεται η λειτουργία συγκεκριμένων IFNs.

### 1.3.2.2.1 Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της IFNβ κατά την ιική μόλυνση

Η επαγωγή των γονιδίων των IFNs τύπου I ρυθμίζεται στο επίπεδο της μεταγραφής και είναι περισσότερο κατανοητή στην περίπτωση της IFNβ (βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 στον άνθρωπο). Ο ενισχυτής και ο κεντρικός υποκινητής της IFNβ καταλαμβάνουν μια περιοχή DNA συνολικού μήκους περίπου 110 ζευγών βάσεων ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής. Η περιοχή του ενισχυτή αντιστοιχεί στα πλέον απομακρυσμένα 55 ζεύγη βάσεων και περιλαμβάνει τα ρυθμιστικά στοιχεία (σε κατεύθυνση 5'→3') PRDIV, PRDIII-I και PRDII (**Εικόνα 25**). Πρόκειται για τρία θετικά ρυθμιστικά στοιχεία (PRDs) στα οποία προσδένονται ισάριθμοι μεταγραφικοί παράγοντες και συγκεκριμένα ένα ετεροδιμερές ATF-2 (μεταγραφικός παράγοντας-ενεργοποιητής)/c-Jun, που συνιστούν το μεταγραφικό παράγοντα AP-1, ένα μέλος της οικογένειας των παραγόντων IRF και ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB αντίστοιχως. Σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη A1 της ομάδας υψηλής κινητικότητας (high mobility group protein A1, HMGA1), οι παραπάνω ενεργοποιητές δένουν στο DNA και σχηματίζουν ένα ιδιαίτερα σταθερό σύμπλοκο, το αποκαλούμενο ενισχύοσωμα, το οποίο ενεργοποιεί τη μεταγραφή από τον υποκινητή της IFNβ κατά την ιική μόλυνση (Ford E and Thanos D, 2010).

Όλες οι πρωτεΐνες που απαιτούνται για την παραγωγή της IFNβ υπάρχουν στο κύτταρο και πριν από την ιική μόλυνση. Εξ αυτών, οι δραστηριότητες των NF-κB και IRF ρυθμίζονται από τον υποκυττάριο εντοπισμό τους. Όπως έχει περιγραφεί παραπάνω, στην ανενεργή κατάσταση, ο NF-κB διατηρείται στο κυτταρόπλασμα από μέλη της οικογένειας των ανασταλτικών IκBs (Silverman and Maniatis, 2001). Παρουσία των διάφορων ερεθισμάτων, όπως της IL-1β, του TNFα και ιών, η IKK ενεργοποιείται και εν συνεχεία φωσφορυλιώνει τον IκB. Μόλις φωσφορυλιώνεται, ο IκB ουβικιτινώνεται και αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα. Ο ελεύθερος NF-κB μεταβαίνει στον πυρήνα και ενεργοποιεί τα γονίδια-στόχους του. Στην PRDIII-I μπορούν να προσδεθούν ομοδιμερή IRF3, IRF7 ή ετεροδιμερή των δύο παραγόντων. Παρόμοια με τον NF-κB, η ανενεργή μορφή IRF3 ή IRF7 είναι επίσης κυτταροπλασματική. Ως απάντηση σε μία ιική απόκριση, ο IRF3/7 φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες TBK1 και IKKi (Fitzgerald KA et al., 2003a; Sharma et al., 2003), διμερίζει και μεταβαίνει στον πυρήνα για να ενεργοποιήσει την έκφραση της IFNβ (Malmgaard, 2004; Taniguchi and Takaoka, 2002). Ένα αρχικό μοντέλο προτείνει ότι ο IRF7 δε συμμετέχει στην πρώτη φάση επαγωγής της IFNβ, καθώς εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα περισσότερα κύτταρα απουσία ιού. Μετά την ιική πρόκληση, η IFNβ, που παράγεται από το IRF3-εξαρτώμενο μονοπάτι που περιγράφεται παραπάνω, προκαλεί τη μεταγραφή του IRF7. Κατόπιν, ο IRF7



ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από τις TBK1/IKK $\beta$  σε ορισμένα σημαντικά κατάλοιπα, ώστε να προσδεθεί και να επάγει τον υποκινητή του γονιδίου της IFN $\beta$  (αλλά κυρίως της IFN $\alpha$ ) (Honda et al., 2005). Η ιική μόλυνση οδηγεί και στην ενεργοποίηση των κινασών στρες, όπως των JNK και p38 κινάσης, που φωσφορυλιώνουν τον ATF-2/c-Jun στον πυρήνα. Ενώ, οι NF- $\kappa$ B και c-Jun/ATF2 ενεργοποιούνται από πολλαπλούς τύπους ερεθισμάτων και ρυθμίζουν τη μεταγραφή μεγάλων κατηγοριών γονιδίων, οι IRF3 εμπλέκεται κυρίως στη ρύθμιση της παραγωγής της IFN $\beta$  (Malmgaard, 2004; Taniguchi and Takaoka, 2002). Το ενισχύσωμα σχηματίζει μία μοναδική τρισδιάστατη επιφάνεια, η οποία αρχικά αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη-συνενεργοποιητή PCAF (P300/CBP-Associated Factor, P300/CBP-συσχετιζόμενος παράγοντας). Ο ενισχυτής της IFN $\beta$  οριοθετείται από νουκλεοσώματα και στις δύο πλευρές, ωστόσο η ίδια η ακολουθία του ενισχυτή δεν περιλαμβάνει νουκλεόσωμα. Ο PCAF ακετυλιώνει αρχικά το νουκλεόσωμα, ενώ ένα άγνωστο ένζυμο φωσφορυλιώνει την ιστόνη H3. Το συνδυαστικό μοτίβο ακετυλίωσης, φωσφορυλίωσης και μεθυλίωσης των ιστονών αναγνωρίζεται από μία ειδική ομάδα παραγόντων. Στο σημείο αυτό, ο PCAF απομακρύνεται από τον υποκινητή και αντικαθίσταται από το CBP (CREB binding protein, πρωτεΐνη που δένει στην CREB), ο οποίος προσελκύεται ως σύμπλοκο με ένα ολοένζυμο RNA πολυμεράσης II (PolII), το οποίο περιέχει τους TF (transcription factor, μεταγραφικός παράγοντας) IIE, IIH, IIF και το σύμπλοκο SWI (switch, διακόπτης)/SNF (sucrose non-fermenting, μη-ζύμωση σουκρόζης) (Ford E and Thanos D, 2010). Εάν και ο CBP μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκο με οποιονδήποτε από τους ενεργοποιητές στο ενισχύσωμα ξεχωριστά, η τρισδιάστατη γεωμετρία δημιουργεί μία συνεχή επιφάνεια που διευκολύνει τη συνεργιστική πρόσδεση του CBP με το ενισχύσωμα και η οποία απαιτείται για τη συνεργιστική ενεργοποίηση της μεταγραφής της IFN $\beta$  (Ford E and Thanos D, 2010). Το σύμπλοκο SWI/SNF αλλάζει τη δομή του νουκλεοσώματος, επιτρέποντας την προσέγκυση και την πρόσδεση στο DNA του TFIID στο κουτί TATA. Η πρόσδεση αυτή κάμπει το

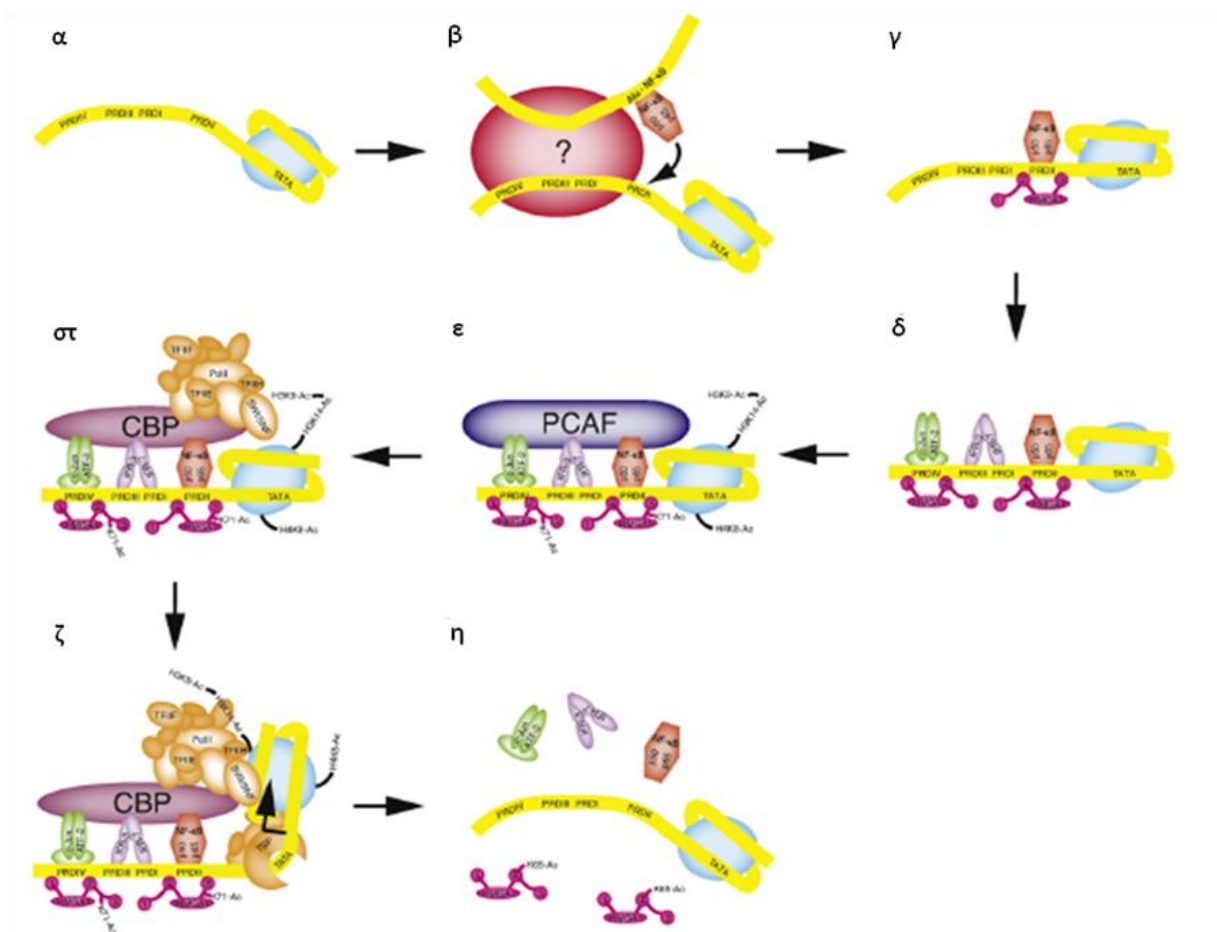
Οι IRFs είναι μεταγραφικοί μεσολαβητές σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από ιούς, βακτήρια και IFNs και κατέχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην αντι-ιική άμυνα, στην ανοσιακή απόκριση, στην απόπτωση και στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης. Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί εννέα γονίδια κυτταρικών IRFs στον άνθρωπο (IRF1-9), καθώς και ανάλογα των IRFs σε ιούς. Οι παράγοντες αυτοί έχουν σημαντική ομολογία στα 115 N-τελικά αμινοξέα, που σχηματίζουν ένα μοτίβο έλικας-στροφής-έλικας και αποτελούν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA. Η περιοχή αυτή αναγνωρίζει μία συναινετική αλληλουχία DNA που αποκαλείται στοιχείο απόκρισης στην ενεργοποίηση με IFN (ISRE, IFN-stimulated response element) (Escalante CR et al., 1998;). Η μοναδική λειτουργία κάθε IRF οφείλεται σε έναν συνδυασμό της κυτταροειδικής έκφρασης, της ενδογενούς δυνατότητας ετερόπλευρης ενεργοποίησης και της ικανότητας αλληλεπίδρασης με άλλα μέλη της οικογένειας των IRFs ή με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και συμπάροντες (Taniguchi T et al., 2001). Όλοι οι IRFs, εκτός των IRF1 και IRF2, διαθέτουν την IRF-σχετιζόμενη περιοχή (IRF-associated domain, IAD) στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, που διαμεσολαβεί αυτές τις αλληλεπιδράσεις.



DNA και προκαλεί ολίσθηση του τροποποιημένου από το SWI/SNF νουκλεοσώματος 36 bp καταρροϊκά, επιτρέποντας την έναρξη της μεταγραφής (**Εικόνα 25**) (Ford E and Thanos D, 2010).

**IRF3:** Ο IRF3 (μαζί με τον IRF7) αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της γονιδιακής έκφρασης των IFNs τύπου I κατά την ιική προσβολή. Ο IRF3 εκφράζεται συνεχώς και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Όταν τα κύτταρα μολυνθούν με ιούς, η ενεργοποίηση συγκεκριμένων PRRs (συμπεριλαμβανομένων των TLR3, TLR4, RIG-1, MDA5) οδηγεί στη φωσφορυλίωση του IRF3 σε μία συστάδα καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης στη C-τελική περιοχή, όπου η σερίνη 386 είναι ουσιώδης για την ενεργοποίηση από τις TBK1 και IKKι (Fitzgerald KA et al., 2003a; McWhirter SM et al., 2004; Sharma S et al., 2003). Εν συνεχεία, ο ενεργοποιημένος IRF3 σχηματίζει ομο- ή ετεροδιμερή με τον IRF7 και μεταβαίνει στον πυρήνα, όπου συνδέεται με τις CBP/P300 (Lin R et al., 1998; Weaver BK et al., 1998; Yoneyama M et al., 1998) και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου της IFNβ, καθώς και άλλων γονιδίων που επάγονται από τις IFNs (ISG, interferon stimulated gene) (Grandvaux N et al., 2002; Juang YT et al., 1998; Lin R et al., 1999; Peters KL et al., 2002). Έχει δειχθεί ότι ο IRF3 ενεργοποιεί κατά προτίμηση το γονίδιο της IFNβ και όχι εκείνα της IFNα (με εξαίρεση το γονίδιο της IFNα4), ενώ ο IRF7 ενεργοποιεί κυρίως τα γονίδια της IFNα. Τέλος, φαίνεται ότι οι παραπάνω IRFs συμμετέχουν και στην επαγωγή των γονιδίων της IFN τύπου III (Osterlund PI et al., 2007).

Ποντικοί με ομόζυγη απάλειψη του IRF3 παρουσιάζουν εξασθένηση στην επαγωγή των τύπου I IFNs από τον ECMV, ενώ η αντι-ιική απόκριση IRF3<sup>-/-</sup> MEFs στον VSV ήταν φυσιολογική. Ωστόσο, η έκφραση των IFNs τύπου I μετά τη μόλυνση των IRF3<sup>-/-</sup> MEFs με NDV ήταν αρκετά μειωμένη, εάν και η εκτοπική έκφραση του IRF7 μπορούσε να την επαναφέρει σε φυσιολογικά επίπεδα (Sato M et al., 2000). Αντιθέτως, σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, δεν επηρεάστηκε σημαντικά η ιική επαγωγή των IFNs τύπου I σε IRF3<sup>-/-</sup> MEFs και πλασματοειδή δενδριτικά κύτταρα (Honda K et al., 2005a). Παρά αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα, δεν υπάρχει αμφιβολία για τον ουσιώδη ρόλο του IRF3 στην αντι-ιική απόκριση. Αρχικά, η έκφρασή του σε όλους τους κυτταρικούς τύπους επιτρέπει την ενεργοποίηση της αντι-ιικής απόκρισης και τη σύνθεση της IFNβ σε κάθε είδος μολυσμένου κυττάρου (Lowther WJ et al., 1999) και δεύτερον, ακόμα και χαμηλά επίπεδα αυτοκρινούς ή παρακρινούς IFNβ κινητοποιούν την ενίσχυση της αντι-ιικής απόκρισης (Marie I et al., 1998; Sato M et al., 1998). Τέλος, η παρατήρηση ότι πολλοί ιοί αποτρέπουν την επαγωγή των IFNs τύπου I στοχεύοντας στη λειτουργία του IRF3, υπογραμμίζει τη σημασία του παράγοντα αυτού στην άμυνα εναντίον των ιών (Katze MG et al., 2002; Weber F et al., 2004).



**Εικόνα 25. Η διαδικασία σχηματισμού του ενισχυσώματος.**

(α) Το γυμνό DNA του ενισχυτή. (β) Ένα ειδικό στοιχείο με μία θέση πρόσδεσης NF-κB μεταφέρει το NF-κB στον ενισχυτή της IFNβ. (γ) Ο NF-κB προσδέεται στον ενισχυτή συνεργιστικά με την HMGA1 στην PRDII θέση. (δ) Οι ATF-2/c-Jun και IRF3/7 προσδέονται με έναν ιδιαίτερα συνεργιστικό τρόπο με τους NF-κB και HMGA1. (ε) Ο PCAF προσελκύεται στον ενισχυτή και ακετυλιώνει την HMGA1 και τις ιστόνες H3 και H4. (στ) Ένα σύμπλοκο ολοενζύμου CBP–PolIII αντικαθιστά τον PCAF. Οι SWI/SNF αναδιοργανώνουν το κοντινό νουκλεόσωμα. (ζ) Ο TFIIID δένει και επάγει την ολίσθηση του νουκλεοσώματος. (η) Ο CBP ακετυλιώνει την HMGA1 και οι πρωτεΐνες του ενισχυσώματος αποσυνδέονται από τον ενισχυτή (Ford E and Thanos D, 2010).

#### 1.4 ΣΚΟΠΟΣ

Η TRX και στη συνέχεια και η GRX ανακαλύφθηκαν ως δότες ηλεκτρονίου για τη ριβονουκλεοτιδική αναγωγή της *E. coli*. Οι πρωτεΐνες αυτές, όπως και άλλες με την αναδίπλωση της θειορεδοξίνης, αποδείχτηκαν η «καρδιά» πολυάριθμων θεμελιωδών διεργασιών σε όλα τα είδη ζωντανών οργανισμών. Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να φέρει στο φως καινούρια μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν οι TRX2 και η GRX1.

Συγκεκριμένα οι στόχοι μας μπορούν να συνοψιστούν στα κάτωθι:

1. Να διερευνήσουμε πώς το μιτοχονδριακό σύστημα της θειορεδοξίνης εμπλέκεται στη ρύθμιση της NO-επαγόμενης HIF-1α.

2. Να εξετάσουμε εάν η GRX1 εμπλέκεται σε μονοπάτια ενδογενούς ανοσίας μέσω της δυνατότητάς της να καταλύει την απογλουταθειονυλίωση των πρωτεϊνών στόχων. Για το λόγο αυτό, μελετήσαμε δύο μονοπάτια:
- ❖ το μονοπάτι της ιικής επαγωγής της IFNβ.
  - ❖ το μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κΒ από την IL-1 και το LPS.



**υλικά και μέθοδοι**



## 2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Τα HEK 293 (ATCC) κύτταρα προέκυψαν από το μετασχηματισμό κυτταρικών σειρών από νεφρό εμβρύου ανθρώπου (έτσι εξηγείται και η ονομασία HEK: Human Embryonic Kidney) με το κομμένο DNA του αδενοϊού 5 και περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1977 (Graham FL et al., 1977).

Η κυτταρική σειρά HeLa (ATCC) προήλθε από κύτταρα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας της Henrietta Lacks, στο DNA των οποίων ενσωματώθηκε μέρος του γονιδιώματος του Human Papillomavirus (HPV) και για αυτό «αθανатоποιήθηκαν».

Τα RAW 267.4 (ATCC) μακροφάγα προέρχονται από το *Mus musculus* και δημιουργήθηκαν από όγκο προερχόμενο από τον ιό Abelson Murine Leukemia Virus.

### 2.1.1 Ανακαλλιέργεια

#### Υλικά

DMEM (*Sigma*)

ορός εμβρύου βοός (FBS, *GIBCO/BRL*)

L-γλουταμίνη (*Sigma*)

γενταμικίνη (*GIBCO/BRL*)

RPMI 1640 (*PAA, Linz, Austria*)

ορός εμβρύου μόσχου (*Biochrom, Berlin, Germany*)

πενικιλίνη (*GIBCO/BRL*)

στρεπτομικίνη (*GIBCO/BRL*)

G418 (*Sigma-Aldrich*)

δοχεία καλλιέργειας (*SARSTEDT*)

διάλυμα 0,25% τρυψίνης - 1 mM EDTA (*GIBCO*)

κωνικό σωληνάριο τύπου falcon (*SARSTEDT*)

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε ασηπτικές συνθήκες, ενώ πριν από την έναρξή της έχει ήδη προετοιμαστεί το πλήρες θρεπτικό υλικό (**Πίνακες 7 και 8**).

Πίνακας 7. Σύσταση Πλήρους Θρεπτικού Μέσου Καλλιέργειας HeLa και HEK 293	
Συστατικά	Αναλογία
DMEM	90%
ορός εμβρύου βοός	10%
L-γλουταμίνη	2 mM
γενταμικίνη	80 µg/ml

**Πίνακας 8. Σύσταση Πλήρους Θρεπτικού Μέσου Καλλιέργειας RAW 264.7**

Συστατικά	Αναλογία
RPMI 1640	90%
ορός εμβρύου μόσχου	10%
L-γλουταμίνη	2 mM
Πενικιλίνη	100 units/ml
Στρεπτομυκίνη	100 µg/ml

Οι κυτταροσειρές HEK σταθερά επιμολυσμένες με τον άδειο φορέα έκφρασης, με την TRX1, την TRX2 ή την TRXR2 (Damdimopoulos AE et al., 2002; Nalvarte I et al., 2004a; Zhou J et al., 2007) καλλιεργήθηκαν παρουσία 500 µg/ml G418 (*Sigma-Aldrich*). Για 24 ώρες πριν από τα πειράματα τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε θρεπτικό χωρίς G418.

Τα κύτταρα επάζονται σε ειδικά δοχεία καλλιέργειας (*SARSTEDT*) τα οποία μετά την προσθήκη όλων των απαραίτητων συστατικών τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος (37 °C, 95% υγρασία, 5% CO<sub>2</sub>). Για τις συγκεκριμένες κυτταροσειρές απαιτείται η επικάλυψη των δοχείων καλλιέργειας με ζελατίνη για την καλύτερη προσκόλλησή τους. Την προσκόλληση ακολουθεί η διαίρεση και η επέκταση των κυττάρων. Όταν καλυφθεί το 70-80% του δοχείου καλλιέργειας, τα κύτταρα πρέπει να αποκολληθούν, να απομονωθούν και να επιστρωθούν σε αντίστοιχα τρυβλία ανάλογα με την πειραματική διαδικασία που θα ακολουθηθεί.

1. Αφαίρεση του πλήρους θρεπτικού υλικού από το δοχείο καλλιέργειας
2. Εκπλύσεις με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, ώστε να απομακρυνθούν τα κατάλοιπα του ορού ο οποίος αναστέλλει τη δράση της θρυψίνης.
3. Επώαση (1 λεπτό τα HEK και περίπου 3 τα HeLa) σε διάλυμα 0,25% τρυψίνης - 1 mM EDTA (*GIBCO*) (3 ml/φλάσκα 75cm<sup>2</sup>, 1 ml/φλάσκα 25cm<sup>2</sup>) στους 37°C. Στο φωτονικό μικροσκόπιο ελέγχεται εάν τα κύτταρα έχουν αρχίσει να συρρικνώνονται, να ξεχωρίζουν και να αποκολλώνται.
4. Τα κύτταρα αναδιαλύονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό (12 ml στη μεγάλη φλάσκα, 4 ml στη μικρή φλάσκα) που περιέχει και τους αναστολείς της τρυψίνης που βρίσκονται στον ορό.
5. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε κωνικό σωληνάριο τύπου falcon προκειμένου να φυγοκεντρηθούν στις 1500 rpm για 3 λεπτά.
6. Κατόπιν, απομακρύνεται το υπερκείμενο, το ίζημα επαναδιαλύεται σε καινούριο, πλήρες θρεπτικό, μετρώνται τα κύτταρα με αιμοκυτταρόμετρο και επεξεργάζονται περαιτέρω ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος.



### 2.1.2 Ψύξη-Απόψυξη Κυττάρων

#### Υλικά

υλικά ανακαλλιέργειας (βλ. 2.1.1)

DMSO (*Sigma-Aldrich*)

ειδικά σωληνάρια παγώματος (*NUNC*)

γλυκόζη (*Sigma-Aldrich*)

Η διατήρηση των ζωικών κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι δυνατή με την αποθήκευσή τους σε υγρό άζωτο (θερμοκρασίες μεταξύ  $-135^{\circ}\text{C}$  και  $-170^{\circ}\text{C}$ ). Η επιτυχής διατήρησή τους προϋποθέτει να βρίσκονται σε καλή κατάσταση πριν από την ψύξη τους και αυτή να πραγματοποιηθεί βαθμιαία μέχρι ενός σημείου, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό τους και να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια νερού. Για το λόγο αυτό, επίσης, τα κύτταρα καταψύχονται παρουσία διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Μετά την παραπάνω φυγοκέντρωση (Βήμα 5) το ίζημα επαναδιαλύεται σε ορό και μεταφέρεται στα ειδικά σωληνάρια παγώματος (cryovials), όπου προστίθεται το μέσο παγώματος, σε αναλογία 1 προς 4 στον τελικό όγκο παγώματος. Το μέσο παγώματος αποτελείται από 12% (w/v) γλυκόζη, 40% (v/v) DMSO διαλυμένα σε θρεπτικό. Το σωληνάριο με τα κύτταρα τοποθετείται αρχικά στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρεται σε κατάλληλο δοχείο αποθήκευσης με υγρό άζωτο, όπου και διατηρούνται μέχρι να αποψυχθούν.

Στην απόψυξη τα κύτταρα πρέπει να περάσουν απότομα από τη χαμηλή θερμοκρασία στους  $37^{\circ}\text{C}$ , ώστε η απόψυξη των κρυστάλλων να τα τραυματίσει όσο το δυνατόν λιγότερο. Για το λόγο αυτό, όταν τα σωληνάρια ανασύρονται από το υγρό άζωτο, επωάζονται στους  $37^{\circ}\text{C}$  και το περιεχόμενό τους μεταφέρεται γρήγορα σε κωνικά σωληνάρια τύπου falcon που περιέχουν πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο επίσης έχει εξισορροπηθεί προηγουμένως σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$ . Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται όπως κατά την ανακαλλιέργεια προκειμένου να απομακρυνθεί η κρυσταλλοπροστατευτική ουσία (DMSO), αλλά και όλα τα νεκρά κύτταρα. Επαναδιαλύονται σε πλήρες θρεπτικό μέσο και τοποθετούνται σε κατάλληλο δοχείο καλλιέργειας.

### 2.1.3 Επιμόλυνση Κυττάρων (Transfection)

#### Υλικά

υλικά ανακαλλιέργειας (βλ. 2.1.1)

Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*)

Για τα πειράματα προσωρινής επιμόλυνσης (transient transfection),  $3 \times 10^5$  κύτταρα ανά ml καλλιέργειας επιμολύνονται χρησιμοποιώντας τη Lipofectamine 2000 βάσει των οδηγιών της εταιρείας. Μετά από 4 ώρες επώασης, το μίγμα της επιμόλυνσης αντικαθίσταται με πλήρες θρεπτικό καλλιέργειας. Η απομόνωση των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιείται 20-24 ώρες μετά την επιμόλυνση.

#### 2.1.4 Μόλυνση Κυττάρων με Ιό

##### Υλικά

υλικά ανακαλλιέργειας (βλ. 2.1.1)

Sendai virus (SV, Cantell strain; *Charles River laboratories*)

Οι ιικές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν με 50 hemagglutinating units Sendai virus (SV, Cantell strain; *Charles River laboratories*) ανά mL μέσου καλλιέργειας (χωρίς αντιβιοτικό) για τα υποδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα.

#### 2.1.5 Χορήγηση BSO

##### Υλικά

υλικά ανακαλλιέργειας (βλ. 2.1.1)

BSO (*Sigma*)

Το L-buthionine-(S,R)-sulphoximine (BSO) αποτελεί αναστολέα της σύνθεσης GSH (Anderson ME, 1997). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο της *Sigma* σε συγκεντρώσεις και για χρονικά διαστήματα που αναφέρονται στα αντίστοιχα πειράματα.

#### 2.1.6 Χορήγηση IL-1

##### Υλικά

υλικά ανακαλλιέργειας (βλ. 2.1.1)

ανθρώπινη ανασυνδυασμένη IL-1β (*PeproTech*)

Οι επαγωγές με ανασυνδυασμένη IL-1β πραγματοποιήθηκαν με 15 ng/ml θρεπτικού μέσου DMEM για 25 λεπτά, εκτός αν αναφέρεται αλλιώς.

#### 2.1.7 Συγκαλλιέργεια Κυττάρων HEK και RAW264.7

##### Υλικά

υλικά ανακαλλιέργειας (βλ. 2.1.1)

δοχεία καλλιέργειας με διαχωριστική μεμβράνη (*BD Biosciences, Heidelberg, Germany*)

LPS (*Sigma*)

IFNγ (*PeproTech*)

phosphate buffered saline (PBS, *GIBCO*)

L-NAME (*Sigma*)

Τα κύτταρα συγκαλλιεργήθηκαν με τη χρήση διαχωριστικών προκειμένου τα κύτταρα να διαχωρίζονται μέσω μεμβράνης με πόρους 1-μm.

1.  $1 \times 10^6$  RAW264.7 κύτταρα επιστρώθηκαν σε 6-άρια πιάτα.
2. Ενεργοποίηση με LPS (1 μg/ml) και IFNγ (100 U/ml) για 16 ώρες.
3. Πλύση με PBS.
4. Προσθήκη φρέσκου θρεπτικού με ή χωρίς 1 mM L-nitroarginine methyl ester (L-NAME, *Sigma*).

5. Παράλληλα,  $1 \times 10^6$  HEK κύτταρα επιστρωμένα σε συγκαλλιερρητικά ένθετα, προστίθενται.
6. Τα κύτταρα συγκαλλιερρούνται για 8 ώρες.

### 2.1.8 Σήμανση με το ραδιοϊσότοπο $^{35}\text{S}$

#### Υλικά

υλικά ανακαλλιέρειας (βλ. ενότητα 2.1.1)

θρεπτικό χωρίς μεθειονίνη και ορό (*Promocell, Heidelberg, Germany*)

$[^{35}\text{S}]$ methionine (*Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Germany*)

GSNO (*Fukuda R et al., 2002*)

υλικά για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (βλ. ενότητα 2.9)

1. Τα κύτταρα καλλιερρούνται για 30' σε θρεπτικό χωρίς μεθειονίνη και ορό.
2. Αντικατάσταση του θρεπτικού με θρεπτικό χωρίς μεθειονίνη που περιέχει 10% FCS και 100  $\mu\text{Ci/ml}$   $[^{35}\text{S}]$ methionine.
3. Τα κύτταρα επώζονται παρουσία ή απουσία 0,5 mM GSNO (*Fukuda R et al., 2002*) για 2 h.
4. Τα κύτταρα λύνονται και ηλεκτροφορούνται σε 10% SDS-PAGE (βλ. ενότητα 2.9). Η γέλη στεγνώνει και εκτίθεται σε φιλμ ακτίνων X.

### 2.1.9 Μέτρηση ATP

#### Υλικά

υλικά ανακαλλιέρειας (βλ. ενότητα 2.1.1)

ATP-διάλυμα λύσης (βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα)

υλικά για δοκιμασία Bradford (βλ. ενότητα 2.5)

ATP Bioluminescent Assay Kit (*Sigma, Schnellendorf, Germany*)

1. Τα κύτταρα επιστρώνονται στα πιάτα μία ημέρα πριν από τα πειράματα.
2. Μετά την αντίστοιχη επεξεργασία, τα κύτταρα συλλέγονται και λύνονται στο ATP-διάλυμα λύσης και κατεργάζονται με υπερήχους (sonication).
3. Φυγοκέντρηση (15,000g, 15 min, 4°C).
4. Μέτρηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου στο υπερκείμενο (*Bradford, βλ. ενότητα 2.5*).
5. Αραίωση των δειγμάτων (1:100) σε νερό.
6. Μέτρηση του ATP με το ATP Bioluminescent Assay Kit βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή.

#### αντιδραστήρια και διαλύματα

##### ATP-διάλυμα λύσης

50 mM Tris/HCl (*Sigma-Aldrich*)

150 mM NaCl (*Sigma-Aldrich*)

0.5% Nonidet-40 (*Sigma-Aldrich*)

protease inhibitor cocktail, pH 7.5 (*Sigma-Aldrich*)

## 2.2 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ

Η αρχή της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA είναι η σύνδεση δύο ή περισσότερων διακριτών τμημάτων DNA, ώστε να προκύψει ένα μόνο μόριο DNA ικανό να αντιγράφεται αυτόνομα σε έναν συγκεκριμένο ξενιστή. Οι απλούστερες κατασκευές υβριδικών μορίων DNA περιλαμβάνουν την κλωνοποίηση παρεμβαλλόμενων αλληλουχιών σε πλασμιδιακούς ή ιϊκούς φορείς κλωνοποίησης. Οι παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες μπορεί να προέρχονται ουσιαστικά από οποιονδήποτε οργανισμό και μπορεί να έχουν απομονωθεί απευθείας από το γονιδίωμα, από mRNA ή από άλλα κλωνοποιημένα τμήματα DNA (σε αυτή την περίπτωση η διαδικασία ονομάζεται υποκλωνοποίηση). Εναλλακτικά, τα παρεμβαλλόμενα DNAs ενδέχεται να έχουν δημιουργηθεί άμεσα μέσω DNA σύνθεσης.

Προκειμένου να κατασκευαστούν τα νέα μόρια DNA, τα αρχικά DNAs επεξεργάζονται με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και άλλα ένζυμα, εάν είναι απαραίτητο. Τα διαφορετικά συστατικά του επιθυμητού μορίου DNA καθαρίζονται μετά από ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης, στη συνέχεια αναμιγνύονται και επωάζονται με DNA λιγάση. Τα προϊόντα του μίγματος αυτού (μαζί με τα αντίστοιχα μίγματα ελέγχου) εισάγονται σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* (βακτηριακός μετασχηματισμός, bacterial transformation) και τα μετασχηματισμένα κύτταρα αναγνωρίζονται μέσω κατάλληλης γενετικής επιλογής. Για την παρούσα μελέτη, οι φορείς κλωνοποίησης ήταν πλασμίδια που φέρουν γονίδια, το προϊόν έκφρασης των οποίων προστατεύει τα βακτήρια από τη δράση συγκεκριμένων αντιβιοτικών (genes for antibiotic resistance). Χρησιμοποιώντας στη βακτηριακή καλλιέργεια το αντίστοιχο αντιβιοτικό, σχηματίζουν αποικίες μόνο τα βακτήρια που έχουν μετασχηματιστεί με το ανασυνδυασμένο DNA. Στη συνέχεια απομονώνεται DNA από τις αποικίες (ή τις πλάκες στην περίπτωση των ιϊκών φορέων κλωνοποίησης) και υπόκειται σε χαρτογράφηση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες προκειμένου να διερευνηθεί εάν έχει δημιουργηθεί το επιθυμητό μόριο DNA.

### 2.2.1 Πλασμιδιακές κατασκευές

➤ Τα πλασμίδια αναφοράς PRDII<sub>4</sub>-luc, PRDIII-I<sub>3</sub>-luc, -110-luc και IL-8-luc κατασκευάστηκαν με κλωνοποίηση τεσσάρων PRDII, επτά PRDIII-I θέσεων, του υποκινητή της IFNβ (-1 ως -110 bp αναρροϊκά του κωδικονίου έναρξης του γονιδίου της IFNβ) και του υποκινητή της IL-8 (θέσεις -40 έως +40) αντίστοιχα στον pGL3 φορέα κλωνοποίησης (Promega) (Koutroubas, 2008). Αυτά τα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις ενεργοποίησης των NF-κB, IRF και του υποκινητή της IFNβ.

➤ Το πλασμίδιο GFP-IRF3 κατασκευάστηκε μετά από κλωνοποίηση ολόκληρου του Ανοιχτού Πλαισίου Ανάγνωσης (ΑΠΑ) του IRF3 στο pEGFP-C2 φορέα έκφρασης (*BD Biosciences*) και χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα μετάβασης του IRF3 στον πυρήνα. Για το συγκεκριμένο σκοπό χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινήτες:

5'-GCGAAGCTTGGGAACCCCAAAGCCACGGATC-3' (παράλληλος εκκινήτης, με έντονα γράμματα είναι η θέση που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII)

5'-GCGTCTAGATCAGCTCTCCCCAGGGCCCTG-3' (αντιπαράλληλος εκκινήτης, με έντονα γράμματα είναι η θέση που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση XbaI)

➤ Το pIRES-GRX1 κατασκευάστηκε μετά από κλωνοποίηση ολόκληρου του ΑΠΑ της GRX1 στον pIRES-neo φορέα έκφρασης (CLONTECH) και χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα υπερέκφρασης της GRX1. Για το συγκεκριμένο σκοπό χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

5'-GCGGAATTCGCCACCATGGATTAC-3' (παράλληλος εκκινητής, με έντονα γράμματα είναι η θέση που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, ενώ με πλάγια γράμματα η θέση Kozak)

5'-GCGGGATCCTTACTGCAGAGCTCCAATC-3' (αντιπαράλληλος εκκινητής, με έντονα γράμματα είναι η θέση που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI)

➤ Τα πλασμίδια GAL4-luc (5xGAL4-TATA-luc) (Sun P et al., 1994), GAL4-IRF3 DN133 (Senger K et al., 2000), GAL4-VP16 (White J et al., 1992), IL-8 promoter-luc (Agelopoulos, 2006), pRSV-CBP (Merika M et al., 1998), pCDNA3-HA-Ub (Ehrlund A et al., 2009), pCDNA3-FLAG-TRAF6, pGK-β-gal (Luftig M et al., 2003) και pCDNA3-TLR4 (Fitzgerald KA et al., 2003a) έχουν περιγραφεί.

➤ Το pCDNA3-IL-1R1 ήταν ευγενική παροχή του Dr. O'Neill (Trinity College Δουβλίνο, Δουβλίνο, Ιρλανδία) (Brint EK et al., 2002).

➤ Το pCDNA3-FLAG-ΔRF-TRAF6 κατασκευάστηκε με σημειακή μετάλλαξη του cDNA του TRAF6 αντικαθιστώντας τις κυστεΐνες 73 και 93 σε αλανίνη.

➤ Τα μεταλλαγμένα pCDNA3-FLAG-IRF3 C167S, C222S, C267S, C289S, C347S και C371S, καθώς και το pCDNA3-FLAG-ΔRF-TRAF6 δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια του QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE).

➤ Το πλασμίδιο pHRE-Luc που φέρει τρία στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE) της ερυθροποιητίνης ήταν ευγενική προσφορά του Dr. T. Kietzmann (Technical University of Kaiserslautern, Kaiserslautern, Germany). Το πλασμίδιο αναφοράς pCap-luc αποκτήθηκε από την Promega. Ο Dr. S. Weg-Remers (Institute of Toxicology and Genetics, Research Center Karlsruhe of the Helmholtz-Society, Karlsruhe, Germany) προσέφερε τα πλασμίδια με την ενεργή πρωτεΐνη σύντηξης ERK2-MEK1 (pERK2-MEK1-LA) και την ανενεργή μεταλλαγμένη κινάση ERK-MEK1-K52R (pERK2-MEK1-KR) (Robinson MJ et al., 1998; Weg-Remers S et al., 2002)

➤ Το σύστημα Vector pSuperior-puro siRNA είναι της Oligo Engine και χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία σταθερά επιμολυσμένων κυτταρικών σειρών με siRNA (βλ. ενότητα 2.4). Όλες οι πλασμιδιακές κατασκευές ελέγχθηκαν με αλληλούχηση DNA.

### Πειραματική πορεία

#### **Υλικά**

σωληνάρια προπυλενίου 1,5 mL (SARSTEDT)

10× διάλυμα περιοριστικής ενδονουκλεάσης (New England Biolabs, NEB)

περιοριστικές ενδονουκλεάσες (NEB)

αλκαλική φωσφατάση (Calf intestine phosphatase, CIP, NEB)

10× διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης (NEB)

10 mM ATP (NEB)

T4 DNA λιγάσης (NEB)

10× διάλυμα T4 DNA λιγάσης (NEB)

διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE (βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα)

βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma-Aldrich)

αγαρόζη (*Sigma-Aldrich*)

10x διάλυμα φορτώματος (**βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα**)

μίγμα τμημάτων DNA γνωστού μοριακού βάρους (1 kb DNA marker, *Invitrogen*)

υδατόλουτρο 55°C

συσσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης γέλης

πλατφόρμα τοποθέτησης της γέλης

χτενάκια γέλης

τροφοδοτικό

κιτ απομόνωσης DNA από αγαρόζη (*QIAGEN*)

LB μέσο (*Sigma-Aldrich*)

LB άγαρ (*Sigma-Aldrich*)

αντιβιοτικά (*Sigma-Aldrich*)

υδατόλουτρο 42°C

κλίβανος 37°C

ρότορας 37°C

κιτ απομόνωσης DNA σε μικρή κλίμακα (*QIAGEN*)

**1.** Σε όγκο αντίδρασης 20 μl πραγματοποιείται η πέψη ενός μορίου DNA με μία ή περισσότερες περιοριστικές ενδονουκλεάσες στις κατάλληλες συνθήκες αντίδρασης (συνήθως στους 37°C). Το μίγμα περιέχει:

x μl DNA (0,1 ως 4 μg DNA σε H<sub>2</sub>O ή TE διάλυμα)

2 μl 10x διάλυμα περιοριστικής ενδονουκλεάσης

18 – x μl H<sub>2</sub>O

και 1 έως 5 U/μg DNA περιοριστική(ές) ενδονουκλεάση(ες)

**2.** Μετά το πέρας της αντίδρασης (συνήθως 2-3 ώρες) πραγματοποιείται διακοπή της αντίδρασης (πολλά ένζυμα χρειάζονται απενεργοποίηση μέσω θέρμανσης στους 65°C για 20 λεπτά ή στους 75°C για 15 λεπτά). Εάν δεν είναι απαραίτητες περαιτέρω ενζυμικές επεξεργασίες του DNA ακολουθεί το **Βήμα 4**.

**3.** Εάν το 5' άκρο κάποιου DNA πρέπει να απομακρυνθεί, στο παραπάνω μίγμα πέψης προστίθενται 2 μl 10x διαλύματος CIP και 1 U CIP και το μίγμα επωάζεται 30 με 60 λεπτά στους 37°C. Μετά το πέρας της αντίδρασης η CIP απενεργοποιείται με θέρμανση στους 75°C για 15 λεπτά.

**4.** Ηλεκτροφόρηση των τμημάτων DNA σε γέλη αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης (**Πίνακας 10**) υπό σταθερή τάση (συνήθως 1 έως 10 V/cm). Στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο τελικής συγκέντρωσης 0,5 μg/ml. Με αυτό τον τρόπο, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το DNA μπορεί να γίνει ορατό με τη χρήση λάμπας UV.

**Πίνακας 9. Κατάλληλες συγκεντρώσεις αγαρόζης για το διαχωρισμό τμημάτων DNA διαφόρων μεγεθών**

<i>Αγαρόζη (%) σε 0,5x TBE</i>	<i>Αποτελεσματικό εύρος διαχωρισμού γραμμικών τμημάτων DNA (kb)</i>
0,5	30 έως 1
0,7	12 έως 0,8
1,0	10 έως 0,5
1,2	7 έως 0,4
1,5	3 έως 0,2

5. Απομόνωση των επιθυμητών τμημάτων DNA από γέλη αγαρόζης με τη χρήση κιτ απομόνωσης (QIAGEN).

6. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο μικροφυγοκέντρου προστίθενται:

9 μl των συστατικών DNAs (0,1 έως 5 μg)

2 μl 10x διαλύματος λιγάσης

1 μl 10 mM ATP

20 έως 500 U T4 DNA λιγάσης

Το μίγμα επωάζεται για 1 έως 24 hr στους 15°C.

7. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* του στελέχους XL1-blue με 1 έως 10 μl από τα προϊόντα της αντίδρασης της λιγάσης:

➤ Στην κατάλληλη ποσότητα DNA (~10 ng ή παραπάνω, όταν πρόκειται για αντιδράσεις λιγάσης) προστίθενται 100 μl δεκτικών κυττάρων.

➤ Επώαση του μίγματος στον πάγο για 10 λεπτά.

➤ Επώαση του μίγματος στους 42°C για 2 λεπτά.

➤ Προσθήκη 1 mL LB μέσου σε κάθε σωληνάριο. Επώαση χωρίς ανάδευση στους 37°C για 1 ώρα.

➤ Επίστρωση τμημάτων της καλλιέργειας μετασχηματισμού σε πιάτα LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό.

➤ Επώαση για 12-16 ώρες στους 37°C.

8. Μεταφορά αποικιών σε υγρή καλλιέργεια (3-5 mL LB/αποικία) και επώαση για 16-18 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση.

9. Από κάθε αποικία ακολουθεί απομόνωση DNA με το κιτ για απομόνωση DNA σε μικρή κλίμακα (QIAGEN).

10. Χαρτογράφηση των απομονωμένων DNAs με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

**αντιδραστήρια και διαλύματα****10× διάλυμα φορτώματος**20% Ficoll 400 (*Sigma-Aldrich*)0,1 M disodium EDTA, pH 8,0 (*SIGMA*)1,0%θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS, *Sigma-Aldrich*)0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης (*Sigma-Aldrich*)**TBE (Tris/borate/EDTA) διάλυμα ηλεκτροφόρησης**

10× διάλυμα:

890 mM Tris base (*Sigma-Aldrich*)890 mM boric acid (*Sigma-Aldrich*)20 mM EDTA, pH 8,0 (*Sigma-Aldrich*)**2.2.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Η κλωνοποίηση μέσω PCR είναι συνήθως ταχύτερη και πιο ευέλικτη σε σχέση με τις κοινές τεχνικές που απαιτούν ήδη υπάρχουσες θέσεις περιορισμού και ποσότητες DNA της τάξεως των μικρογραμμάριων. Σε αυτή τη μέθοδο, συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν νέες και μοναδικές θέσεις περιορισμού χρησιμοποιούνται για να πολλαπλασιάσουν την περιοχή του DNA που πρόκειται να υποκλωνοποιηθεί σε έναν φορέα που φέρει συμβατές θέσεις περιορισμού.

Πειραματική πορεία**Υλικά**

DNA-καλούπι (1 έως 10 ng πλασμιδιακού DNA; 20 έως 300 ng γενωμικού ή cDNA)

εκκινητές (10 μM, **βλ. Ενότητα 2.1**, *Invitrogen*)Pfu DNA πολυμεράση (*Promega*)10× διάλυμα Pfu DNA πολυμεράσης (*Promega*)μίγμα 4dNTPs (2mM από το καθένα, *NEB*)

αυτόματος θερμοκυκλοποιητής

πλαστικά σωληνάρια PCR με λεπτά τοιχώματα (*Sigma-Aldrich*)

1. Στο σωληνάριο της PCR σε τελικό όγκο 50 μl τοποθετούνται:

5 μl 10× διάλυμα Pfu DNA πολυμεράσης

1 μl 10 μM παράλληλος εκκινητής

1 μl 10 μM αντιπαράλληλος εκκινητής

5 μl μίγματος των 4 dNTPs (2mM από το καθένα)

DNA-καλούπι

Pfu πολυμεράση 2,5 U

H<sub>2</sub>O έως τα 50 μl

➤ Οι συνθήκες της PCR εξαρτώνται από την αλληλουχία και το μήκος του DNA-καλουπιού, την αλληλουχία και το ποσοστό συμπληρωματικότητας των εκκινητών και το θερμοκυκλοποιητή που χρησιμοποιείται. Τέλος, ο αριθμός των κύκλων εξαρτάται τόσο στην αποτελεσματικότητα της αντίδρασης όσο και στην ποσότητα του DNA-καλουπιού στην αντίδραση.



2. Βάσει των ακόλουθων οδηγιών προγραμματίστηκε ο θερμοκυκλοποιητής ανάλογα με τις απαιτήσεις της κάθε αντίδρασης:

~30 κύκλοι {

- 30'' στους 94°C (αποδιάταξη)
- 30'' στους 55° (για ποσοστό GC στους εκκινητές ≤50%) ή
- 60°C (για ποσοστό GC στους εκκινητές >50%) (επαναδιάταξη)
- 60''/kb προϊόντος στους 72°C (επιμήκυνση)

### 2.2.3 Δεκτικά Κύτταρα XL-1 Blue (competent cells)

#### Πειραματική πορεία

#### **Υλικά**

αποικίες κυττάρων *E. coli* XL-1 Blue (STRATAGENE)

LB μέσο (*Sigma-Aldrich*)

αποστειρωμένο, παγωμένο διάλυμα CaCl<sub>2</sub> (**βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα**)

1. Εμβολιασμός μίας αποικίας κυττάρων *E. coli* XL-1 Blue σε 5 ml LB μέσο.
2. Επάση για 16-18 ώρες στους 37°C με ήπια ανάδευση (250 rpm)
3. 4 ml από την καλλιέργεια εμβολιάζονται σε 400 ml LB
4. Επάση υπό ανάδευση στους 37°C, μέχρι η A<sub>590</sub> να γίνει περίπου 0,3-0,4.
5. Επάση στον πάγο για 5-10 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση για 7 λεπτά στις 1600 × g στους 4°C.
7. Ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος σε 80 ml παγωμένο διάλυμα CaCl<sub>2</sub>.
8. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1100 × g στους 4°C.
9. Ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος σε 80 ml παγωμένο διάλυμα CaCl<sub>2</sub>.
10. Επάση στον πάγο για 30 λεπτά.
11. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1100 × g στους 4°C.
12. Ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος σε 16 ml παγωμένο διάλυμα CaCl<sub>2</sub>.
13. Μοίρασμα των κυττάρων σε αποστειρωμένα σωληνάρια προπυλενίου (περίπου 250 μl/σωληνάριο).
14. Άμεσο πάγωμα στους -70°C.

#### **αντιδραστήρια και διαλύματα**

##### **διάλυμα CaCl<sub>2</sub>**

60 mM CaCl<sub>2</sub> (*Sigma-Aldrich*)

15% γλυκερόλη (*Sigma-Aldrich*)

10 mM PIPES [piperazine-*N,N'*-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid)], pH 7,0 (*Sigma-Aldrich*)

### 2.3 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ

Η επιμόλυνση αποτελεί την πλέον κοινά χρησιμοποιούμενη διαδικασία για την *in vivo* ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης στα θηλαστικά. Πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν συστήματα που βασίζονται σε συντηγμένα γονίδια και υπολογίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε χρονικό διάστημα 48 ωρών από την εισαγωγή του DNA. Το συντηγμένο γονίδιο συνήθως αποτελείται από τη θέση πρόσδεσης του ενεργοποιητή στον υποκινητή ή από την αλληλουχία ενισχυτή που μελετάται

προσκολλημένη σε ένα γονίδιο που οδηγεί στη σύνθεση ενός μορίου-αναφοράς. Η ποσότητα της πρωτεΐνης-αναφοράς που συντίθεται υπό διαφορετικές συνθήκες θεωρείται ότι αντανακλά την ικανότητα της ένθετης αλληλουχίας να καθοδηγήσει ή/ και να προωθήσει τη μεταγραφή. Προφανώς, ένα χρήσιμο σύστημα προσωρινής επιμόλυνσης θα πρέπει να βασίζεται στη σύνθεση μίας εύκολα προσδιοριζόμενης πρωτεΐνης-αναφοράς η οποία έχει ελάχιστες ή καθόλου επιδράσεις στη φυσιολογία του επιμολυσμένου κυττάρου. Ιδεατά, η δοκιμασία για αυτό το μόριο-αναφοράς θα πρέπει να είναι εξαιρετικά ευαίσθητη.

Η κλωνοποίηση του γονιδίου της λουσιφεράσης (*luc*) από την πυγολαμπίδα *Photinus pyralis* (De Wet JR et al., 1987) παρείχε το πρώτο μη-ισοτοπικό γονιδιακό σύστημα αναφοράς με ευρεία χρήση στα κύτταρα των θηλαστικών. Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας χρησιμοποιείται ευρέως ως πρωτεΐνη-αναφοράς για τους ακόλουθους λόγους:

- Η πρωτεΐνη δε χρειάζεται μετα-μεταφραστική τροποποίηση (De Wet JR et al., 1987; Ow DW et al., 1986).

- Η δοκιμασία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη, επειδή η εκπομπή φωτός έχει τη μεγαλύτερη γνωστή κβαντική απόδοση από οποιαδήποτε άλλη αντίδραση χημειοφωταύγειας, ενώ δε φαίνεται να υπάρχει χημειοφωταύγεια υποβάθρου.

- Η διαδικασία είναι γρήγορη, απαιτώντας μόνο μερικά δευτερόλεπτα ανά δείγμα.

Το παραπάνω ένζυμο είναι μία μονομερής πρωτεΐνη 61 kDa, που καταλύει την οξειδωση της λουσιφερίνης χρησιμοποιώντας  $ATP \cdot Mg^{2+}$  ως συν-υπόστρωμα. Στο σύστημα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, στην αντίδραση χρησιμοποιείται το συνένζυμο A (CoA) για τη βελτίωση της κινητικής (Wood KV, 1991), επιτρέποντας καλύτερη ανακύκλωση του ενζύμου και οδηγώντας σε αυξημένη ένταση φωτός που είναι σχεδόν σταθερή για τουλάχιστον 1 λεπτό.

Το *lacZ* γονίδιο από την *E. coli*, το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση, είναι γονίδιο αναφοράς με πλήθος εφαρμογών. Το ένζυμο καταλύει την υδρόλυση ποικίλων β-γαλακτοσιδίων. Η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης υπό τον έλεγχο ενός συστατικού υποκινητή χρησιμοποιείται συχνά ως εσωτερικό control, για να κανονικοποιήσει τη μεταβλητότητα άλλων συστημάτων αναφοράς. Η β-γαλακτοσιδάση είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την κανονικοποίηση της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας, καθώς τα κυτταρικά εκχυλίσματα που παρασκευάζονται για τη μέτρησή της είναι επίσης κατάλληλα για τη μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης (Alam J and Cook JL, 1990). Η ανάπτυξη χημειοφωταυγών 1,2-διοξετανίων υποστρωμάτων για τη β-γαλακτοσιδάση έχει προωθήσει ιδιαίτερα τη χρησιμότητα του *lacZ* ως μεταγραφικού γονιδίου-αναφοράς αυξάνοντας την ευαισθησία της δοκιμασίας και επεκτείνοντας το γραμμικό εύρος ανίχνευσης (Bronstein I et al., 1994).

### Πειραματική πορεία

#### **Υλικά**

κύτταρα επιμολυσμένα με τους φορείς έκφρασης της λουσιφεράσης και της β-γαλακτοσιδάσης 24 ώρες νωρίτερα (pGK-β-gal) **(βλ. 2.1.3)** σε πιάτα 12 «πηγαδιών»

PBS

5x διάλυμα λύσης (*Promega*)

διάλυμα μέτρησης λουσιφεράσης (*Promega*)

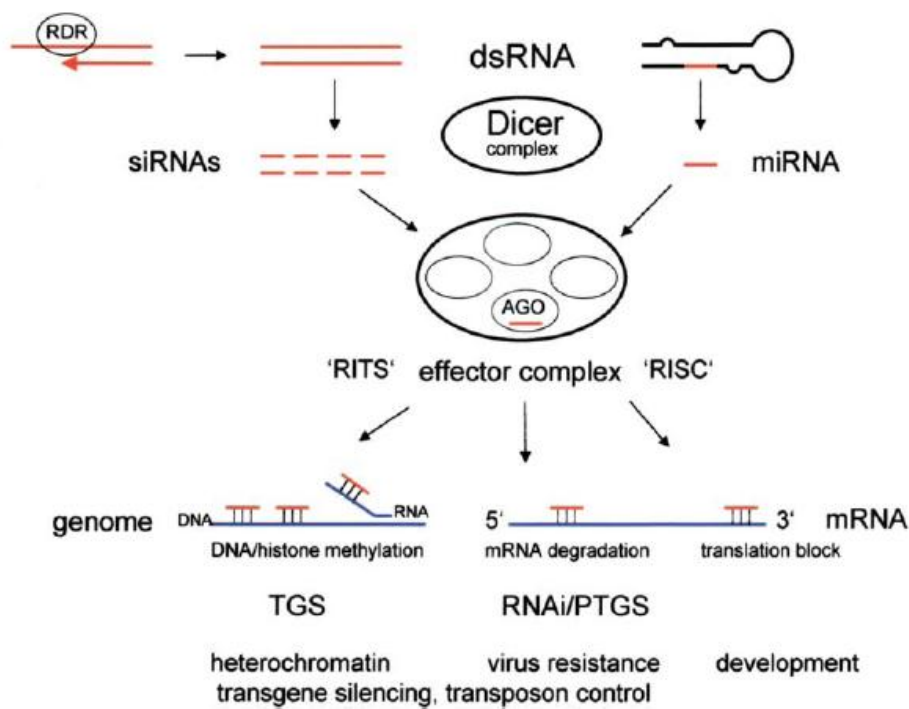
σύστημα μέτρησης β-γαλακτοσιδάσης (*Tropix, Bedford, MA*)  
χημειοφωταυγείόμετρο  
κυβέττες (*Berthold*)

1. 3 πλύσεις με PBS.
2. Τα κύτταρα συγκεντρώνονται σε PBS και φυγοκεντρώνονται για 5' στις 10.000 rpm.
3. Απομακρύνεται το υπερκείμενο.
4. Τα κύτταρα διαλύονται σε 1x διάλυμα λύσης.
5. Vortex για 10''.
6. 15' σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
7. Vortex.
8. Η μέτρηση της λουσιφεράσης πραγματοποιείται με το σύστημα της *Promega*, με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.
9. Η μέτρηση της β-γαλακτοσιδάσης πραγματοποιείται με το σύστημα *Tropix (Bedford, MA)*, με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.
  - ✓ Στα πειράματα υπερέκφρασης του CBP, οι μετρήσεις λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν με το ποσό της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος, όπως αυτό προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (**βλ. ενότητα 2.5**).

## 2.4 RNA ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ (RNAi)

Όταν τα ευκαρυωτικά κύτταρα μολύνονται από ιούς ή όταν μεταθετά στοιχεία ενσωματώνονται τυχαία στο γονιδίωμα των ξενιστών, παράγεται συχνά δίκλωνο RNA (double-stranded RNA, dsRNA) από τα γονίδια εισβολείς. Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει ένα σύστημα άμυνας των κυττάρων που αποκρίνεται στο dsRNA και προστατεύει τα γονιδιώματά τους από αυτά τα ξένα στοιχεία-εισβολείς (**Εικόνα 26**). Το dsRNA κόβεται άμεσα από ένα κυτταρικό ένζυμο (*Dicer*) σε μικρά τμήματα dsRNA διαφορετικού μεγέθους και δομής (*Bernstein E et al., 2001*), τα οποία στη συνέχεια κατευθύνουν την ειδική αποικοδόμηση των μονόκλωνων mRNAs των γονιδίων-εισβολέων (*Elbashir SM et al., 2001*). Αυτά τα μικρά δίκλιωνα RNAs ονομάστηκαν μικρά επεμβατικά RNAs (short interfering RNAs, siRNAs). Η όλη διαδικασία της μετα-μεταγραφικής απενεργοποίησης γονιδίων μέσω dsRNA χαρακτηρίζεται ως RNA-αποσιώπηση (RNA interference, RNAi) (*Hammond SM et al., 2001; Hutvagner G and Zamore PD, 2002; Matzke M et al., 2001; Sharp, 2001; Tuschl T, 2001; Waterhouse PM et al., 2001*).

Στην παρούσα μελέτη οι σταθερά επιμολυσμένες με siRNA κυτταρικές σειρές παρήχθησαν με το σύστημα «pSuperior-puro vector» για επαγωγίμη έκφραση του siRNA (*OligoEngine*). Το σύστημα παρέχει έναν φορέα έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών που κατευθύνει την ενδοκυττάρια σύνθεση μεταγράφων που μοιάζουν με siRNA. Ο φορέας χρησιμοποιεί τον υποκινητή του γονιδίου πολυμεράσης III H1-RNA και παράγει ένα μικρό RNA μετάγραφο που δεν έχει ουρά πολυαδενοσίνης και έχει ένα καλά καθορισμένο σημείο έναρξης της μεταγραφής και ένα σιναίολο τερματισμού που αποτελείται από πέντε θυμιδίνες στη σειρά (T5).



**Εικόνα 26: Μοντέλο μηχανισμού δράσης του RNAi.**

Τα κύτταρα χρησιμοποιούν το ένζυμο dicer για να κοντύνουν τη διπλή αλυσίδα του RNA και να δημιουργήσουν θραύσματα siRNA ή miRNA (microRNA). Μία εξωγενούς προέλευσης διπλή αλυσίδα dsRNA ή ένα ενδογενές προ-miRNA μπορεί να επεξεργαστεί από το dicer και να ενσωματωθεί στο σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex), το οποίο στοχεύει στο αντίστοιχο mRNA, προκαλώντας την καταστολή της μετάφρασης των στοχευθέντων γονιδίων.

Επίσης, τα ακόλουθα ολιγονουκλεοτίδια που κωδικοποιούν τις επιθυμητές αλυσίδες siRNA για το mRNA της GRX1 χρησιμοποιήθηκαν:

5'-GTACCCCATCAAACAAGGGCTTCTTCAAGAGAAGAAGCCCTTGTTTGATGGGGC-3' (κωδική)

5'-TCGAGCCCATCAAACAAGGGCTTCTTCTTGAAGAAGCCCTTGTTTGATGGGGG-3' (αντικωδική)

### Πειραματική πορεία

#### **Υλικά**

HeLa και HEK-293 κύτταρα για επιμόλυνση

κωδική και αντικωδική αλυσίδα siRNA (*Invitrogen*)

pSUPER.retro φορέας κλωνοποίησης (*OligoEngine*)

Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*)

τρυβλία καλλιέργειας (*SARSTEDT*)

σωληνάρια προπυλενίου 1,5 mL (*SARSTEDT*)

διάλυμα αναδιάταξης: 100 mM NaCl σε 20 mM διαλύματος φωσφορικού νατρίου pH 6,8

πυρομοκίνη (*SIGMA*)

υλικά κυτταροκαλλιέργειων (**βλ. ενότητα 2.1.1**)

υλικά για κλωνοποίηση DNA (**βλ. ενότητα 2.2.1**)

#### 2.4.1 Αναδιάταξη siRNA και εισαγωγή του στο φορέα κλωνοποίησης

1. Ανάμιξη ίσων ποσοτήτων κωδικής και αντικωδικής αλυσίδας, ώστε η συγκέντρωση του siRNA (διπλή αλυσίδα) να είναι 20  $\mu\text{M}$  σε τελικό όγκο 100-500  $\mu\text{l}$  διαλύματος αναδιάταξης.
2. Θέρμανση ενός γυάλινου ποτηριού που περιέχει 500 ml νερού μέχρι τους 90°C σε έναν μαγνητικό αναδευτήρα με προσαρμόσιμη θερμοκρασία.
3. Το σωληνάριο με την αντίδραση τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή επίπλευσης στο ποτήρι και επωάζεται για 3 λεπτά στους 90°C.
4. Διακόπτεται η θέρμανση και το υδατόλουτρο φτάνει σταδιακά σε θερμοκρασία δωματίου (~3 ώρες), ενώ πραγματοποιείται η αναδιάταξη του siRNA.
5. Ο pSUPER.retro φορέας κλωνοποίησης γίνεται γραμμικός μετά από πέψη με BglIII and HindIII.
6. Τα αναδιατεταγμένα ολιγονουκλεοτίδια κλωνοποιούνται στο φορέα κλωνοποίησης.
7. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων XL1 blue με το ανασυνδυασμένο μόριο.
8. Μεταφορά αποικιών σε υγρή καλλιέργεια.
9. Απομόνωση DNA.

#### 2.4.2 Δημιουργία κυτταρικών σειρών σταθερά επιμολυσμένων με το siRNA της GRX1

1. Σε τρυβλία εμβαδού 9,6  $\text{cm}^2$  επιστρώνονται 2 ml που περιέχουν  $3 \times 10^5$  κύτταρα και επωάζουμε για 24 ώρες.
2. Πραγματοποιείται επιμόλυνση των κυττάρων με το siRNA της GRX1 με τη βοήθεια λιποφεκταμίνης βάσει των οδηγιών της κατασκευάστριας εταιρείας. Επίσης, σε κάποια κύτταρα γίνεται επιμόλυνση μόνο με το φορέα κλωνοποίησης και θα χρησιμοποιηθούν ως κυτταροσειρά ελέγχου.
3. 24 ώρες μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και μεταφέρονται σε τρυβλίο εμβαδού 55  $\text{cm}^2$ .
4. 48 ώρες μετά την επιμόλυνση προστίθεται πουρομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 2  $\mu\text{g/ml}$ .
5. Κάθε 48 ώρες πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού μέσου με φρέσκο το οποίο περιέχει 2  $\mu\text{g/ml}$  πουρομυκίνη.
6. Μετά από 7 ημέρες ελέγχεται αν έχουν σχηματιστεί αποικίες στο τρυβλίο.
7. Οι αποικίες μεταφέρονται σε καινούρια τρυβλία εμβαδού 0,95  $\text{cm}^2$ .
8. Ο έλεγχος των αποικιών για τα επίπεδα έκφρασης της GRX1 πραγματοποιήθηκε με Real Time PCR (βλ. ενότητα 2.6).

#### αντιδραστήρια και διαλύματα

##### 100 mM διάλυμα φωσφορικού νατρίου pH 6,8

Διάλυμα A: 27,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ανά λίτρο (0,2 M) (*Sigma-Aldrich*)

Διάλυμα B: 53,65 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ανά λίτρο (0,2 M) (*Sigma-Aldrich*)

Ανάμιξη 51 mL από το διάλυμα A και 49 mL από το διάλυμα B και αραιώση με  $\text{H}_2\text{O}$  μέχρι τα 200 mL

## 2.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η απομόνωση καθαρού, άθικτου RNA από κύτταρα είναι ουσιώδης για πειράματα τα οποία μετρούν επίπεδα μεταγράφων, για κλωνοποίηση άθικτων cDNAs και για τη λειτουργική ανάλυση του RNA μεταβολισμού. Η δυσκολία στην απομόνωση RNA είναι ότι οι περισσότερες ριβονουκλεάσες είναι ιδιαίτερα σταθερά και ενεργά ένζυμα, ενώ δεν απαιτούν συμπαράγοντες για να λειτουργήσουν. Για αυτό και το πρώτο βήμα σε όλα τα πρωτόκολλα απομόνωσης RNA περιλαμβάνει τη λύση των κυττάρων σε χημικό περιβάλλον που οδηγεί σε αποδιάταξη των ριβονουκλεασών. Το RNA εν συνεχεία απομονώνεται από τα υπόλοιπα κυτταρικά μακρομόρια υπό συνθήκες που περιορίζουν ή εξαλείφουν οποιαδήποτε εναπομείνασα ενεργότητα RNάσης. Ο κυτταρικός τύπος από τον οποίο θα απομονωθεί το RNA και η τελική του χρήση καθορίζουν το ποια διαδικασία είναι η καταλληλότερη.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το TRI αντιδραστήριο (Chomczynski, 1987), ένα διάλυμα που χρησιμοποιείται στην απομόνωση πρωτεϊνών/RNA/DNA και βασίζεται στη μέθοδο απομόνωσης Guanidinium thiocyanate-φαινόλης-χλωροφορμίου. Η μέθοδος αυτή προτιμάται για την απομόνωση RNA από έναν μεγάλο αριθμό δειγμάτων, καθώς και από μικρές ποσότητες ιστού ή κυττάρων. Συνεπώς, είναι η πλέον κατάλληλη για μελέτες γονιδιακής έκφρασης που η ποσότητα των κυττάρων ή του ιστού είναι περιορισμένες.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε και θα παρουσιαστεί στη συνέχεια βασίζεται στην ικανότητα του RNA να παραμένει υδατοδιαλυτό σε ένα διάλυμα που περιέχει 4 M guanidine thiocyanate, pH 4, παρουσία μίας οργανικής φάσης φαινόλης/χλωροφορμίου. Υπό τέτοιες όξινες συνθήκες, οι περισσότερες πρωτεΐνες και τα μικρά τμήματα DNA (50 βάσεις με 10 kb) μένουν στην οργανική φάση, ενώ τα μεγαλύτερα τμήματα DNA και μερικές πρωτεΐνες βρίσκονται στη μεσόφαση. Η κατάτμηση του DNA κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης απομακρύνει το DNA από την υδατική φάση.

### Πειραματική πορεία

#### **Υλικά**

H<sub>2</sub>O με DEPC (*Ambion*)

TRI αντιδραστήριο (*Sigma-Aldrich*)

παγωμένο PBS (*GIBCO*)

80% αιθανόλη (*TECHLINE*)

χλωροφόρμιο (*Sigma-Aldrich*)

ισοπροπανόλη (*Sigma-Aldrich*)

σωληνάρια προπυλενίου των 2mL, αποστειρωμένα (*SARSTEDT*)

ρύγχη με φίλτρο (*SARSTEDT*)

ψυχώμενη φυγόκεντρος

1. Τα κύτταρα πλένονται με παγωμένο PBS και στη συνέχεια λύνονται με προσθήκη 1 ml TRI αντιδραστηρίου/ 10 cm<sup>2</sup> επιφάνειας τρυβλίου και μεταφέρονται στα αποστειρωμένα σωληνάρια φυγοκέντρου των 2mL.
2. 5 λεπτά επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να πραγματοποιηθεί η πλήρης αποδιάταξη των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων.

3. Για το διαχωρισμό των φάσεων, προστίθενται 0,2 ml χλωροφορμίου ανά ml αντιδραστηρίου TRI. Ακολουθεί ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα.
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά.
5. Φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση το μίγμα διαχωρίζεται σε μία κατώτερη κόκκινη φάση φαινόλης-χλωροφορμίου, μία ενδιάμεση φάση και μία ανώτερη άχρωμη, υδατική φάση. Το RNA βρίσκεται αποκλειστικά στην ανώτερη φάση.
6. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε καινούριο, αποστειρωμένο σωληνάριο. Για να κατακρημνιστεί το RNA προστίθεται 0,5 mL ισοπροπανόλη ανά ml αντιδραστηρίου TRI.
7. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-15 λεπτά.
8. Φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Το RNA καθιζάνει σχηματίζοντας ένα ίζημα σαν γέλη στις πλευρές και στον πάτο του σωλήνα.
9. Πλήρης απομάκρυνση του υπερκειμένου.
10. Ξέπλυμα με τουλάχιστον 1 ml 80% αιθανόλης ανά ml αντιδραστηρίου TRI.
11. Φυγοκέντρηση στα 7,500 g για 5 λεπτά στους 4°C.
12. Απομάκρυνση του υπερκειμένου.
13. Το RNA στεγνώνει για 5 με 10 λεπτά.
14. Επαναδιάλυση σε H<sub>2</sub>O με DEPC.
15. Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση και η καθαρότητα του RNA μετράται η απορρόφησή του σε κυβέττα χαλαζία στα 260 και στα 280 nm. Ο λόγος  $A_{260}/A_{280}$  πρέπει να είναι πάνω από 1,6.

## 2.6 PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL-TIME PCR)

Η ενζυμική μετατροπή του mRNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) περιλαμβάνει τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase, rt) και την καθοδηγούμενη από εκκινητές σύνθεση cDNA.

Η υψηλή ανάλυση της έκφρασης του RNA μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου. Ο ειδικός σχεδιασμός επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση των επιπέδων μεταγράφων από έναν αριθμό γονιδίων που μας ενδιαφέρουν (genes of Interest, GOIs) χρησιμοποιώντας το κατάλληλο σετ εκκινητών για κάθε γονίδιο (στο εξής ο όρος GOI θα αναφέρεται στο ίδιο το γονίδιο που μας ενδιαφέρει, αλλά και στο RNA μετάγραφο ή στο cDNA αντίγραφο). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενός σήματος φθορισμού. Αυτό το σήμα αυξάνει αναλογικά με το ποσό του προϊόντος της PCR σε μία αντίδραση. Καταγράφοντας το ποσό της εκπομπής φθορισμού σε κάθε κύκλο είναι δυνατή η παρακολούθηση της αντίδρασης της PCR κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης όπου η πρώτη σημαντική αύξηση στο ποσό του προϊόντος της PCR συσχετίζεται με το αρχικό ποσό του καλουπιού-στόχου. Όσο περισσότερα είναι τα αρχικά αντίγραφα του mRNA-στόχου, τόσο γρηγορότερα θα παρατηρηθεί σημαντική αύξηση στο φθορισμό.

Ένα καθορισμένο κατώφλι φθορισμού τοποθετείται σημαντικά υψηλότερα από τη γραμμική αναφοράς και μπορεί να τροποποιηθεί από το χειριστή. Η παράμετρος  $C_T$  (κύκλος-κατώφλι, threshold cycle) ορίζεται ως ο κύκλος στον οποίον η εκπομπή φθορισμού υπερβαίνει το καθορισμένο κατώφλι. Υπάρχουν τρία κύρια συστήματα φθορισμού για την καταγραφή της ενίσχυσης του DNA (Whittwer CT et al., 1997): (1) οι ανιχνευτές υδρόλυσης, (2) οι ανιχνευτές υβριδισμού και (3) οι παράγοντες που προσδένουν στο DNA.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η χημεία της χρώσης που προσδένει στο δίκλωνο DNA και που αποτελεί τη φθηνότερη εναλλακτική λύση. Συγκεκριμένα, η παραγωγή του προϊόντος ποσοτικοποιείται μέσω της χρήσης ενός φθορίζοντα παρεμβαλλόμενου παράγοντα (SYBR-green) ο οποίος δεν προσδένει σε ssDNA. Ο  $C_T$  είναι όταν το σύστημα αρχίζει να ανιχνεύει την αύξηση στο σήμα που σχετίζεται με μία εκθετική αύξηση του προϊόντος της PCR κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής (γραμμικής) φάσης. Αυτή η φάση παρέχει τις πλέον χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την αντίδραση. Η κλίση της φάσης αυτής αποτελεί αντανάκλαση της απόδοσης πολλαπλασιασμού. Η απόδοση αυτή (Efficiency, Eff) μπορεί να υπολογισθεί από τον τύπο:

$$Eff = 10^{(-1/κλίση)} - 1$$

Υπάρχουν δύο είδη ποσοτικοποίησης, η απόλυτη και η σχετική. Κατά την απόλυτη ποσοτικοποίηση υπολογίζεται ο ακριβής αριθμός αντιγράφων του GOI. Κατά τη σχετική ποσοτικοποίηση υπολογίζεται η ποσοτική διαφορά στον αριθμό αντιγράφων μεταξύ των δειγμάτων (υπάρχει δείγμα-μάρτυρας) και η κανονικοποίηση όλων των δειγμάτων γίνεται με ένα ενδογενές γονίδιο-αναφοράς.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) για τη σχετική ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων-στόχων (Livak KJ and Schmittgen TD, 2001). Η μέθοδος αυτή αποτελεί τη μέθοδο-επιλογής όταν το επιθυμητό αποτέλεσμα εκφράζεται σε «φορές αλλαγής, fold-change». Στην περίπτωση αυτή δεν απαιτούνται πρότυπα διαλύματα, οπότε εξοικονομούνται αντιδραστήρια.

Οι υπολογισμοί για την ποσοτικοποίηση ξεκινούν με τη διαφορά των τιμών του  $C_T$  ανάμεσα στο γονίδιο-στόχος και στο γονίδιο αναφοράς:

$$\Delta C_T = C_T (\text{στόχος}) - C_T (\text{αναφορά})$$

Αυτή η τιμή υπολογίζεται για όλα τα δείγματα. Ένα από αυτά τα δείγματα θα πρέπει να οριστεί ως η γραμμή αναφοράς (το δείγμα-μάρτυρας) προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι συγκρίσεις. Η  $\Delta\Delta C_T$  τιμή αποτελεί τη διαφορά μεταξύ του  $\Delta C_T$  κάθε δείγματος και του  $\Delta C_T$  του δείγματος-μάρτυρα. Το τελευταίο βήμα στην ποσοτικοποίηση είναι η μετατροπή αυτών των τιμών σε απόλυτες τιμές μέσω του τύπου:

$$\text{Σχετικό επίπεδο έκφρασης} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

#### Εκκινητές

Τα ακόλουθα ζεύγη εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν για τη Real-Time PCR:

- GRX1 παράλληλος: CACAGCCACCAACCACACTA  
GRX1 αντιπαράλληλος: GCCGCGTCAGCAGTTCCCC
- GRX2 παράλληλος: CTTTGGAGAATTTAGCGACGGC  
GRX2 αντιπαράλληλος: CTGGTTTCCATATTC AAGCAGGT
- IFN $\beta$  παράλληλος: CACGACAGCTCTTCCATGA  
IFN $\beta$  αντιπαράλληλος: AGCCAGTGCTCGATGAATCT
- IL-8 παράλληλος: TAGGACAAGAGCCAGGAAGAAAC  
IL-8 αντιπαράλληλος: GGAGTATGTCTTTATGCACTG
- GAPDH παράλληλος: CATGAGAAGTATGACAACAGCCT  
GAPDH αντιπαράλληλος: AGTCCTTCCACGATACCAAAGT
- HIF-1 $\alpha$  παράλληλος: CTCAAAGTCGGACAGCCTCA  
HIF-1 $\alpha$  αντιπαράλληλος: CCCTGCAGTAGGTTTCTGCT



- Ακτίνη παράλληλος: TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA  
Ακτίνη αντιπαράλληλος: CTAGAAGCATTTGCGGTCGACGATGGAGGG

#### Πειραματική πορεία-Αντίστροφη Μεταγραφή

##### **Υλικά**

H<sub>2</sub>O με DEPC (*Ambion*)

3 mg/ml random primers (*Invitrogen*)

5x διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης (*Invitrogen*)

0,1 M DTT (*Invitrogen*)

dNTPs 2mM από το καθένα (*Invitrogen*)

SuperScript II Αντίστροφη Μεταγραφάση 200 U/μl (*Invitrogen*)

RNAaseOUT 40 U/μl (*Invitrogen*)

1. Σε αποστειρωμένα σωληνάρια προπυλενίου προστίθενται τα εξής:

0,8 μl random primers

2 μg ολικού RNA

H<sub>2</sub>O με DEPC μέχρι τα 7 μl

2. Επώαση στους 65<sup>o</sup>C για 5 λεπτά.

3. Προστίθενται:

4 μl διαλύματος 5x αντίστροφης μεταγραφάσης

2 μl 0,1 M DTT

5 μl dNTPs 2mM από το καθένα

1 μl RNAaseOUT 40 U/μl

1 μl αντίστροφη μεταγραφάση 200 U/μl

4. Επώαση για 12 λεπτά στους 25<sup>o</sup>C.

5. Επώαση για 50 λεπτά στους 42<sup>o</sup>C.

6. Η αντίδραση τερματίζεται με θέρμανση στους 70<sup>o</sup>C για 15 λεπτά.

#### Πειραματική πορεία-Real Time PCR

##### **Υλικά**

εκκινητές (*Invitrogen*)

SYBR Green PCR master mix, 200 αντιδράσεις (*Invitrogen*)

σωληνάρια και καπάκια για Real Time PCR (*Bio-Rad*)

Chromo4 Real-Time (*Bio-Rad*)

Opticon Monitor Version 3.1 λογισμικό (*Bio-Rad*)

1. Ετοιμάζεται το ακόλουθο μίγμα:

12,5 μl μίγμα SYBR Green (2x)  
 0,2 μl cDNA  
 1 μl παράλληλος εκκινητής (10 μM)  
 1 μl αντιπαράλληλος εκκινητής (10 μM)  
 11,3 μl H<sub>2</sub>O

2. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο σύστημα Chromo4 Real-Time (BIORAD) εις τριπλούν βάσει του ακόλουθου προγράμματος:

2' στους 52°C  
 5' στους 95°C

40 κύκλοι { 1' στους 95°C  
 35'' στους 58°C  
 5'' στους 72°C

3. Τα αποτελέσματα αποκτήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Opticon Monitor Version 3.

## 2.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Για να λυθούν τα κύτταρα έχει υιοθετηθεί μία ποικιλία μεθόδων όπως η οσμωτική λύση, η πέψη με ένζυμα και η ομογενοποίηση. Για κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες όπως η αιμοσφαιρίνη δεν απαιτείται περαιτέρω απομόνωση από το διάλυμα. Ωστόσο, πολλές σημαντικές κυτταρικές πρωτεΐνες, όπως αυτές που συνδέονται με μεμβράνες, με συστατικά του κυτταροσκελετού ή με DNA, παραμένουν αδιάλυτες. Για την περαιτέρω διαλυτοποίηση των κυτταρικών πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τόσο μη-ιοντικά (π.χ. Triton X-100) όσο και ιοντικά (π.χ. SDS) απορρυπαντικά. Τα απορρυπαντικά είναι μικρά αμφιπαθή μόρια που αλληλεπιδρούν και με μη-πολικά και με πολικά περιβάλλοντα και διασπούν τη μεμβράνη. Επίσης, προσδέονται σε υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών, όπως είναι οι διαμεμβρανικές περιοχές, αντικαθιστώντας κατ' αυτόν τον τρόπο τις μη ευνοϊκές επαφές ανάμεσα σε υδρόφοβες πρωτεϊνικές περιοχές και το νερό με τις πιο ευνοϊκές υδρόφιλες περιοχές του απορρυπαντικού. Οπότε, οι υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης δε σχηματίζουν ένα συσσωμάτωμα στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα, η πρωτεΐνη γίνεται διαλυτή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες *in vitro* αναλύσεις. Στην παρούσα εργασία, χρειάστηκε να διαχωριστούν οι πυρηνικές από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα υπότονο διάλυμα λύσης που οδήγησε σε διόγκωση των κυττάρων, καθώς και ένα μη ιονικό απορρυπαντικό για τη διάσπαση της κυτταρικής (και όχι της πυρηνικής) μεμβράνης. Με αυτόν τον τρόπο λύσης μπορούν να απομονωθούν άθικτοι πυρήνες. Οι πυρήνες και τα περισσότερα οργανίδια καθαρίζονται σε σουκρόζη, η οποία αποτελεί την πιο διαδεδομένη, ουσία στην υποκυττάρια κλασμάτωση. Η υψηλής ποιότητας σουκρόζη (απαλλαγμένη από τις RNάσες) είναι οικονομικά προσιτή, ιδιαίτερα διαλυτή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα για την παρασκευή διαλυμάτων που καλύπτουν το εύρος πυκνοτήτων των περισσότερων βιολογικών οργανιδίων. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ενός υπέρτονου διαλύματος λύσης, οι πυρήνες συρρικνώνονται λόγω ώσμωσης και όλες οι διαλυτές

πρωτεΐνες εξέρχονται μέσω της πυρηνικής μεμβράνης στο διάλυμα. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι η πυρηνική μεμβράνη δε διασπάται, οπότε το DNA δεν απελευθερώνεται στο διάλυμα λύσης. Έτσι αποφεύγονται οι επίπονες διαδικασίες κατακερματισμού του (π.χ. κατεργασία με υπερήχους).

Από τη στιγμή που απομονωθούν οι πρωτεΐνες πρέπει να υπολογιστεί η συγκέντρωσή τους. Η χρωματομετρική μέθοδος Bradford είναι ευρέως διαδεδομένη και βασίζεται στην αλλαγή της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie όταν η αρχικά κόκκινη μορφή του αντιδραστηρίου αλλάζει και γίνεται μπλε λόγω της πρόσδεσης πρωτεΐνης. Από τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 ( $A_{595}$ ) γνωστών συγκεντρώσεων πρότυπων διαλυμάτων αλβουμίνης από ορό βοός (Bovine Serum Albumin) προκύπτει μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Συγκρίνοντας την απορρόφηση του δείγματος, κάτω από κατάλληλη αραίωση, με την οπτική απορρόφηση των προτύπων, προκύπτει η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο δείγμα.

### Πειραματική πορεία

#### **Υλικά**

PBS, pH 7,4 (GIBCO)

4x SDS-διάλυμα φορτώματος (ROTH)

υδατόλουτρο 100°C

σωληνάρια προπυλενίου 1,5 mL

Bradford κιτ (Sigma-Aldrich)

μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche Diagnostics)

ομογενοποιητής Dounce

ψυχώμενη φυγόκεντρος

υπότονο διάλυμα A (βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα)

υπέρτονο διάλυμα B (βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα)

1. Τα τρυβλία των κυτταροκαλλιιεργειών τοποθετούνται στον πάγο προκειμένου να ανασταλεί η όποια μεταβολική δραστηριότητα.
2. Πλύσεις με PBS, pH 7,4.
3. Τα κύτταρα συλλέγονται σε PBS και μεταφέρονται σε σωληνάριο μικροφυγόκεντρου.
4. Φυγοκέντρηση στα 3000 g για 1 λεπτό.
5. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
6. Ομογενοποίηση με ομογενοποιητή Dounce στο υπότονο διάλυμα A (250  $\mu$ l/10cm<sup>2</sup> τρυβλίο).
7. Φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 20 δευτερόλεπτα στους 4°C.
8. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο και αποτελεί το εκχύλισμα των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών.
9. Αναδιάλυση του ιζήματος (το οποίο αποτελείται κυρίως από πυρήνες) σε Διάλυμα A που περιέχει 0,25 M σουκρόζη.
10. Φυγοκέντρηση στα 1.000 g.
11. 5 εκπλύσεις του ιζήματος με υπότονο διάλυμα A χωρίς σουκρόζη.
12. Αναδιάλυση του ιζήματος σε υπέρτονο διάλυμα B.
13. Επώαση για 20 λεπτά υπό ανάδευση στους 4°C.
14. Φυγοκέντρηση στα 12 000 g για 20 λεπτά στους 4°C.

15. Μεταφορά του υπερκειμένου που αποτελεί το πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα σε νέο σωληνάριο.
16. Οι πρωτεΐνες διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .
17. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών μετρήθηκε με χρήση της δοκιμασίας Bradford.
18. Για τα ολικά κυτταρικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μετά το **Βήμα 5** ακολουθεί προσθήκη 1x SDS-διαλύματος φορτώματος και θέρμανση για 5 λεπτά στους  $100^{\circ}\text{C}$ . Σε αυτή τη μορφή διατηρούνται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### αντιδραστήρια και διαλύματα

#### υπότονο Διάλυμα A

- 10mM HEPES-KOH, pH 7,9 (*Sigma-Aldrich*)
- 1,5mM  $\text{MgCl}_2$  (*Sigma-Aldrich*)
- 10mM KCl (*Sigma-Aldrich*)
- 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (*Sigma-Aldrich*)
- 0,5% Nonidet P-40 (*Sigma-Aldrich*)
- 1mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF, *Sigma-Aldrich*)
- 1x μίγμα αναστολέων πρωτεασών (*Roche Diagnostics*)

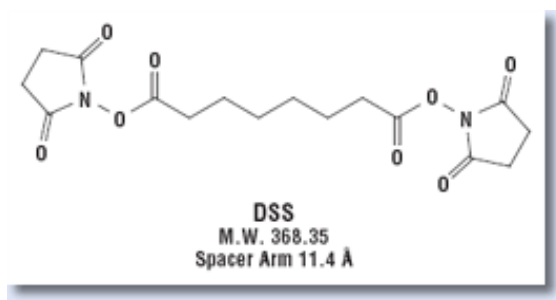
#### υπέρτονο Διάλυμα B

- 25mM HEPES-KOH, pH 7,9 (*Sigma-Aldrich*)
- 420mM NaCl (*Sigma-Aldrich*)
- 1,5mM  $\text{MgCl}_2$  (*Sigma-Aldrich*)
- 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (*Sigma-Aldrich*)
- 0,5% Nonidet P-40 (*Sigma-Aldrich*)
- 1mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF, *Sigma-Aldrich*)
- 1x μίγμα αναστολέων πρωτεασών (*Roche Diagnostics*)

## 2.8 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

Η ανοσοκατακρήμνιση είναι μία τεχνική κατά την οποία ένα αντιγόνο απομονώνεται λόγω της πρόσδεσής του σε ένα ειδικό αντίσωμα που είναι προσδεδεμένο σε «στρώμα καθίζησης». Αρχικά, το συγκεκριμένο αντίσωμα ακινητοποιείται σε ένα καθιζάνον στρώμα στέρεας φάσης. Αν και υπάρχουν πολλοί τρόποι για την πρόσδεση των αντισωμάτων στο στρώμα αυτό, οι πιο κοινές μέθοδοι βασίζονται στην ιδιότητα των ανοσοσφαιρινών να προσδένονται είτε στην πρωτεΐνη A του *Staphylococcus aureus* είτε στην πρωτεΐνη G της ομάδας G των *Streptococcus*. Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται με την πρόσδεση του αντισώματος στην πρωτεΐνη A ή G η οποία είναι ομοιοπολικά προσδεδεμένη σε σφαιρίδια αγαρόζης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια σεφαρόζης (πρόκειται για μία πιο σταθερή μορφή αγαρόζης). Η ανοσοκατακρήμνιση συνήθως πραγματοποιείται με τη χρήση πολυκλωνικών ή μονοκλωνικών αντισωμάτων τα οποία με κάποιες εξαιρέσεις (π.χ. IgG1 από ποντικό) προσδένουν αποτελεσματικά στην πρωτεΐνη A. Τα αντισώματα που δεν προσδένονται στην πρωτεΐνη A-αγαρόζη μπορούν να προσροφηθούν στην πρωτεΐνη G-αγαρόζη χρησιμοποιώντας ακριβώς το ίδιο πρωτόκολλο.

Στην παρούσα εργασία για να διευκολυνθεί η πρόσδεση του αντισώματος στα σφαιρίδια χρησιμοποιήθηκε το DSS (*Pierce*). Το Disuccinimidyl suberate (DSS) περιέχει εστέρες στο κάθε άκρο (**Εικόνα 27**) που μπορούν να αντιδράσουν με πρωτογενείς αμίνες σε pH 7-9 και να σχηματίσουν σταθερούς αμιδικούς δεσμούς. Οι πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων και των αντισωμάτων, έχουν αρκετές πρωτογενείς αμίνες στην πλευρική αλυσίδα των καταλοίπων λυσίνης, καθώς και στο αμινοτερματικό άκρο κάθε πολυπεπτιδίου, που αποτελούν στόχους των εστέρων του DSS. Το DSS διαλύεται αρχικά σε έναν οργανικό διαλύτη όπως είναι το DMF ή το DMSO και στη συνέχεια προστίθεται στην υδατική αντίδραση διασύνδεσης.



**Εικόνα 27:** DSS.

Το τελικό στάδιο της ανοσοκατακρήμνισης περιλαμβάνει το συνδυασμό του κυτταρικού εκχυλίσματος με τα σφαιρίδια στα οποία έχει προσδεθεί το αντίσωμα και την απομόνωση του αντιγόνου. Ένα προαιρετικό βήμα προκαταρκτικού καθαρισμού ενδέχεται να προηγηθεί αυτού του βήματος κατά το οποίο το κυτταρικό εκχύλισμα απορροφάται είτε με «άδεια» σφαιρίδια πρωτεΐνης A-αγαρόζης ή με ένα άσχετο αντίσωμα προσδεδμένο στα σφαιρίδια αυτά. Μετά την πρόσδεση του αντιγόνου στα συνδεδεμένα με το αντίσωμα σφαιρίδια, οι μη προσδεδμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται με διαδοχικά πλυσίματα.

### 2.8.1 Παρασκευή αντισωμάτων συζευγμένων στα σφαιρίδια

#### Υλικά

DSS (*Pierce*)

πρωτεΐνη A ή G-σεφαρόζη (*Roche*)

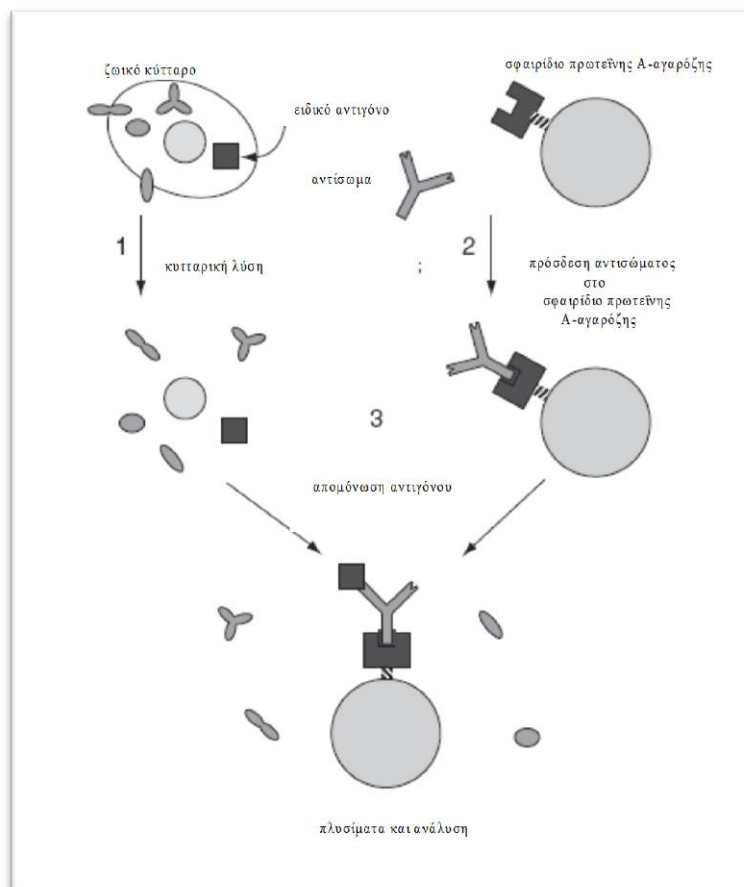
σωληνάρια προπυλενίου 1,5 mL

DMSO (*Sigma-Aldrich*)

αντίσωμα (*Santa Cruz*)

επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος

διάλυμα πρόσδεσης (**βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα**)



**Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της ανοσοκατακρήμνισης.**

1. Σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρου 1,5 ml τοποθετούνται 300 μl εναιωρήματος σφαιριδίων πρωτεΐνης Α-σεφαρόζης (ή πρωτεΐνης G-σεφαρόζης αν το αντίσωμα είναι IgG1 ποντικού) αραιωμένων σε νερό και πλένονται 4 φορές με το διάλυμα πρόσδεσης.
2. Τα σφαιρίδια αναδιαλύονται στο παραπάνω διάλυμα και σε τελικό όγκο 600 μl (προκύπτει έτσι ένα εναιώρημα 50% πυκνό).
3. Προστίθενται 3 μg από το προς πρόσδεση αντίσωμα ανά 50 μl (εν προκειμένω 18 μg αντισώματος).
4. Επώαση για 1-2 ώρες στους 4°C με περιστροφή.
5. 4 πλυσίματα με το διάλυμα πρόσδεσης για να απομακρυνθεί όσο αντίσωμα δεν έχει προσδεθεί.
6. Τα σφαιρίδια αναδιαλύονται σε τελικό όγκο 650 μl στο παραπάνω διάλυμα.
7. Προσθήκη 50 μl φρέσκου διαλύματος 20 mM DSS σε DMSO.
8. Επώαση για 45' σε θερμοκρασία δωματίου με περιστροφή.
9. Προσθήκη 1 mL 1M Tris-HCl pH 7,5 (για τον τερματισμό της αντίδρασης).
10. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10'.
11. Πλύσιμο με 1 mL 0,5M Tris-HCl pH 7.5.
12. Πλύσιμο με 1 mL 0,25M Tris-HCl pH 7,5.

13. 3 πλυσίματα με 25mM Tris-HCl pH 7,5.

14. Τα σφαιρίδια διατηρούνται στους 4°C σε 25mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl σε εναιώρημα 50% πυκνό.

### **αντιδραστήρια και διαλύματα**

#### **διάλυμα πρόσδεσης**

20 mM Hepes pH 7,5 (*Sigma-Aldrich*)

150 mM NaCl (*Sigma-Aldrich*)

### **2.8.2 Ανοσοκατακρήμνιση**

#### **Υλικά**

μερκαπτοαιθανόλη (*Sigma*)

πρωτεΐνη A ή G-σεφαρόζη (*Roche*)

σωληνάρια προπυλενίου 1,5 mL

επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος

2x διάλυμα φορτώματος (**βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα**)

1. Σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρου 1,5 ml τοποθετούνται 50 μl εναιωρήματος σφαιριδίων πρωτεΐνης A-σεφαρόζης (ή πρωτεΐνης G-σεφαρόζης αν το αντίσωμα είναι IgG1 ποντικού) σε εναιώρημα 25mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl 50% πυκνό. Επίσης, τοποθετούνται 0,3-1 mg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (ανάλογα με το αντίσωμα και τα επίπεδα της πρωτεΐνης στο κύτταρο). Ο τελικός όγκος όλων των δειγμάτων πρέπει να είναι ο ίδιος.

2. 30' επώαση στους 4°C με περιστροφή (το βήμα αυτό αποτελεί τον προκαταρκτικό καθαρισμό, preclear, των πρωτεϊνών).

3. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μεταφέρεται σε καινούριο σωληνάριο μικροφυγοκέντρου και προστίθενται 50 μl από τα συζευγμένα με το αντίσωμα σφαιρίδια.

4. Επώαση για 1-2 ώρες στους 4°C με περιστροφή.

5. Απομάκρυνση του υπερκειμένου.

6. 4 πλυσίματα των σφαιριδίων με 25mM Tris-HCl pH 7,5.

7. Προσθήκη 2x διαλύματος φορτώματος (αραιωμένο στο διάλυμα των πλυσιμάτων), 2% μερκαπτοαιθανόλης και έκλυση των πρωτεϊνών με θέρμανση στους 92°C για 10'.

### **αντιδραστήρια και διαλύματα**

#### **2x διάλυμα φορτώματος**

20% γλυκερόλη (*Sigma-Aldrich*)

4% SDS (*Sigma-Aldrich*)

2,5% w/v bromophenol blue (*Sigma-Aldrich*)

25% 1M Tris – HCl pH 6,8 (*Sigma-Aldrich*)

H<sub>2</sub>O

## 2.9 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΜΙΑΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

Η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει σύνθετα μίγματα πρωτεϊνών (π.χ. από κύτταρα, υποκυττάρια κλάσματα ή ανοσοσυμπλέγματα), να διερευνήσει τη σύσταση και να πιστοποιήσει την ομοιογένεια των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Κατά την ηλεκτροφόρηση σε γέλη ακρυλαμίδης, οι πρωτεΐνες κινούνται λόγω ενός ηλεκτρικού πεδίου μέσω πόρων στο στρώμα της γέλης. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης τόσο μειώνεται το μέγεθος των πόρων. Ο συνδυασμός του μεγέθους των πόρων της γέλης και του φορτίου, του μεγέθους και του σχήματος της πρωτεΐνης καθορίζει το ρυθμό μετατόπισης της πρωτεΐνης.

Όταν στόχος είναι να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες βάσει μεγέθους και όχι βάσει φορτίου ή σχήματος, τότε πραγματοποιείται αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση. Συνήθως ως αποδιατακτικό χρησιμοποιείται το θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) σε συνδυασμό με κάποιον αναγωγικό παράγοντα και θερμότητα. Αυτός ο τύπος ηλεκτροφόρησης αναφέρεται συνήθως ως ηλεκτροφόρηση σε γέλη SDS-πολυακρυλαμίδης (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE). Η χρήση ενός ασυνεχούς συστήματος (δλδ. απόθεση πήκτωμάτων «επιστοιβάξης» και «διαχωρισμού») οδηγεί στη συγκέντρωση των αραιωμένων δειγμάτων και στην αυξημένη ευκρίνεια των ζωνών.

Το επιθυμητό ποσοστό της ακρυλαμίδης στο πήκτωμα διαχωρισμού εξαρτάται από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που διαχωρίζεται. Σε γενικές γραμμές χρησιμοποιείται 5% γέλη για πρωτεΐνες από 60 έως 200 kDa, 10% γέλη για πρωτεΐνες από 16 έως 70 kDa και 15% γέλη για πρωτεΐνες από 12 έως 45 kDa. Το πήκτωμα επιστοιβάξης είναι το ίδιο ανεξάρτητα από το πήκτωμα διαχωρισμού που χρησιμοποιείται.

Μία ακόμα χρήσιμη μέθοδος για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των κυτταρικών πρωτεϊνών είναι η μίας διάστασης ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Αυτό που διακρίνει αυτή τη μέθοδο από την προηγούμενη είναι ότι τα πρωτεϊνικά δείγματα δεν εκτίθενται σε αποδιατακτικούς παράγοντες (π.χ. SDS ή ουρία). Έτσι οι πρωτεΐνες κινούνται ανάλογα με τις φυσικές τους ιδιότητες, δηλαδή το μέγεθος, το σχήμα και το φορτίο. Επιτρέπεται, λοιπόν, η ανάλυση της ολιγομερικής κατάστασης των πρωτεϊνών, των αλλαγών στη στερεοδιάταξη και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που επηρεάζουν τη διαμόρφωση ή το φορτίο, ενώ έχουν ελάχιστες επιδράσεις στο μοριακό βάρος των πρωτεϊνών.

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών ακολουθεί η ανοσοσύτπωση (γνωστή και ως στύπωση κατά Western). Το πρώτο βήμα αυτής της τεχνικής περιλαμβάνει την ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών από τη γέλη σε μία μεμβράνη. Η μεμβράνη, που κατά αυτόν τον τρόπο γίνεται ένα ακριβές αντίγραφο της γέλης της πολυακρυλαμίδης, στη συνέχεια ερευνάται για την ύπαρξη συγκεκριμένων πρωτεϊνών με τη βοήθεια των αντίστοιχων αντισωμάτων. Τα πρωτογενή αντισώματα ανιχνεύονται κατόπιν με τη βοήθεια δευτερογενών αντισωμάτων συζευγμένων με την υπεροξειδάση του μαύρου ραπανιού. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μετατροπή του υποστρώματός του σε προϊόν που εκπέμπει χημειοφωταύγεια.



### 2.9.1 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης

#### Υλικά

διαλύματα για τις γέλες επιστοιβάξης και διαχωρισμού (βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα)  
ισοπροπανόλη (*Sigma-Aldrich*)

30% ακρυλαμίδη/0,8% bis-ακρυλαμίδη (*Roth*)

2X και 4X SDS διαλύματα φόρτωσης (βλ. 2.8.2)

μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (marker, *Invitrogen*)

1X SDS διάλυμα ηλεκτροφόρησης (βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα)

συσκευή ηλεκτροφόρησης (*Bio-Rad*)

φίλτρα 0,45-μm (για την παρασκευή των διαλυμάτων)

0,75-mm και 1,5 mm χτενάκια Teflon με 9 ή 10 θέσεις (*Bio-Rad*)

τροφοδοτικό σταθερής παροχής

1. Προετοιμασία του πηκτώματος διαχωρισμού όπως φαίνεται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Γέλες πολυακρυλαμίδης διαχωρισμού <sup>α</sup>						
Διάλυμα στοκ	Τελική συγκέντρωση ακρυλαμίδης στη γέλη διαχωρισμού (%)					
	5	6	7	8	9	10
30% ακρυλαμίδη/ 0,8% bis- ακρυλαμίδη (mL)	2,50	3,00	3,50	4,00	4,50	5,00
4X Tris·Cl/SDS, pH 8,8 (mL)	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
H <sub>2</sub> O (mL)	8,75	8,25	7,75	7,25	6,75	6,25
10% (w/v) ammonium persulfate (APS) (mL)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED <sup>β</sup> (mL)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

<sup>α</sup> Παράγονται 15 ml γέλης διαχωρισμού που είναι αρκετή ποσότητα για μία γέλη διαστάσεων 1,5 mm X 14 cm X 16 cm

<sup>β</sup> TEMED, N,N,N,N-tetramethylethylenediamine

2. Το διάλυμα της γέλης τοποθετείται άμεσα (αλλιώς θα πολυμεριστεί) στο σάντουιτς ανάμεσα στα δύο τζαμάκια μέχρι να φτάσει σε ύψος περίπου 11 cm.
3. Χρησιμοποιώντας πιπέττα Pasteur καλύπτεται η επιφάνεια της γέλης διαχωρισμού με ένα στρώμα ισοπροπανόλης πάχους ~1 cm. Το στρώμα αυτό αποτελεί ένα εμπόδιο για το οξυγόνο που αναστέλλει τον πολυμερισμό, ενώ επιτρέπει τη δημιουργία επίπεδης ενδιάμεσης φάσης κατά το σχηματισμό της γέλης.
4. Η γέλη χρειάζεται περίπου 30-60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να πολυμεριστεί.
5. Απομακρύνεται εντελώς το στρώμα της ισοπροπανόλης.

<b>Πίνακας 11. Γέλη πολυακρυλαμίδης επιστοιίβαξης<sup>a</sup></b>	
<b>Διάλυμα στοκ</b>	<b>Όγκος στο διάλυμα της γέλης επιστοιίβαξης (mL)</b>
<b>30% ακρυλαμίδη/ 0,8% bis-ακρυλαμίδη</b>	0,650
<b>4X Tris·Cl/SDS, pH 6,8</b>	1,250
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3,050
<b>10% (w/v) ammonium persulfate (APS)</b>	0,025
<b>TEMED</b>	0,005

<sup>a</sup> Παράγονται 5 ml γέλης επιστοιίβαξης που είναι αρκετή ποσότητα για μία γέλη διαστάσεων 1,5 mm X 14 cm X 16 cm

6. Προετοιμασία του πηκτώματος επιστοιίβαξης όπως φαίνεται στον **Πίνακα 11**.
7. Το διάλυμα της γέλης τοποθετείται άμεσα πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού και στη συνέχεια τοποθετείται το αντίστοιχο χτενάκι.
8. Η γέλη χρειάζεται περίπου 30-60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να πολυμεριστεί.
9. Απομακρύνεται προσεχτικά το «χτενάκι» και τα πηγαδάκια ξεπλένονται με 1x διάλυμα SDS.
10. Η γέλη τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή.
11. Στη συσκευή τοποθετείται 1x SDS διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
12. Τα πρωτεϊνικά δείγματα στα οποία έχει προστεθεί το κατάλληλο διάλυμα φόρτωσης τοποθετούνται στα αντίστοιχα πηγαδάκια. Σε ένα πηγαδάκι τοποθετείται μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους.
13. Συνδέεται το τροφοδοτικό στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και για μία γέλη πάχους 0,75 mm ρυθμίζεται σε σταθερή ένταση 10 mA μέχρι η χρωστική να περάσει στο πήκτωμα διαχωρισμού. Στη συνέχεια η ένταση αυξάνεται στα 15 mA.

#### **αντιδραστήρια και διαλύματα**

##### **4X Tris·Cl/SDS, pH 6.8**

0,5 M Tris·Cl με 0,4% SDS

##### **4X Tris·Cl/SDS, pH 8.8**

1,5 M Tris·Cl με 0,4% SDS

**SDS διάλυμα ηλεκτροφόρησης, 5X**

0,125 M Tris base

0,96 M glycine

0,5% SDS

H<sub>2</sub>O**2.9.2 Μη-αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης (native gel)****Υλικά**

διάλυμα για τη γέλη (βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα)

30% ακρυλαμίδη/0,8% bis-ακρυλαμίδη (Roth)

διάλυμα φόρτωσης (βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα)

διαλύματα ηλεκτροφόρησης ανόδου και καθόδου (βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα)

συσκευή ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad)

φίλτρα 0,45 μm (για την παρασκευή των διαλυμάτων)

0,75 mm και 1,5 mm χτενάκια Teflon με 9 ή 10 θέσεις (Bio-Rad)

τροφοδοτικό σταθερής παροχής

1. Προετοιμασία του πηκτώματος διαχωρισμού όπως φαίνεται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Μη-αποδιατακτικές γέλες πολυακρυλαμίδης <sup>α</sup>							
Διάλυμα στοκ	Τελική συγκέντρωση ακρυλαμίδης στη γέλη διαχωρισμού (%)						
	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
30% ακρυλαμίδη/ 0,8% bis- ακρυλαμίδη (mL)	3,35	5,00	6,65	8,40	10,00	11,66	13,30
4X Tris·Cl/ pH 8,8 (mL)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
H <sub>2</sub> O (mL)	11,54	9,89	8,24	6,49	4,89	3,23	1,59
10% (w/v) ammonium persulfate (APS) (mL)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
TEMED (mL)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

<sup>α</sup> Παράγονται 20 ml γέλης διαχωρισμού που είναι αρκετή ποσότητα για μία γέλη διαστάσεων 1,5 mm X 14 cm X 16 cm

2. Το διάλυμα της γέλης τοποθετείται άμεσα (αλλιώς θα πολυμεριστεί) στο σάντουιτς ανάμεσα στα δύο τζαμάκια μέχρι να φτάσει σε ύψος περίπου 2 cm από την κορυφή. Τοποθετείται άμεσα το χτενάκι.
  3. Η γέλη χρειάζεται περίπου 30-60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να πολυμεριστεί.
  4. Απομακρύνεται προσεχτικά το «χτενάκι» και τα πηγαδάκια ξεπλένονται με 1x διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
  5. Η γέλη τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή.
  6. Στην άνοδο και την κάθοδο της συσκευής τοποθετούνται τα αντίστοιχα διαλύματα ηλεκτροφόρησης.
  7. Συνδέεται το τροφοδοτικό στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και για μία γέλη πάχους 1,5 mm ρυθμίζεται σε σταθερή ένταση 40 mA για 30'.
- Σε αυτό το στάδιο απομακρύνονται φορτισμένα συστατικά από τη γέλη, όπως το APS, πριν από την τοποθέτηση των δειγμάτων στα «πηγαδάκια».*
8. Τα πρωτεϊνικά δείγματα στα οποία έχει προστεθεί το κατάλληλο διάλυμα φόρτωσης τοποθετούνται στα αντίστοιχα πηγαδάκια.
  9. Ηλεκτροφόρηση στα 15 mA για 1 ώρα.
  10. Η γέλη τοποθετείται σε 25 mL 1x SDS-διαλύματος ηλεκτροφόρησης (βλέπε παραπάνω) για 30'.

#### **αντιδραστήρια και διαλύματα**

##### **4X Tris-Cl, pH 8.8**

1,5 M Tris-Cl με 0,4% SDS

##### **διαλύματα ηλεκτροφόρησης**

Άνοδος (-) 25 mM Tris-HCl (*Sigma-Aldrich*)  
 192 mM γλυκίνη (*Sigma-Aldrich*)  
 1% deoxycholate (DOC, *Sigma-Aldrich*)  
 pH 8,4  
 διατηρείται στους 4°C

Κάθοδος (+) 25 mM Tris-HCl (*Sigma-Aldrich*)  
 192 mM γλυκίνη (*Sigma-Aldrich*)  
 pH 8,4  
 διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου

##### **διάλυμα φορτώματος**

125 mM Tris-HCl (*Sigma-Aldrich*)  
 30% γλυκερόλη (*Sigma-Aldrich*)  
 2% DOC (*Sigma-Aldrich*)  
 pH 6,8  
 διατηρείται στους 4°C

### 2.9.3 Ανοσοσύπωση κατά Western

#### Υλικά

διάλυμα μεταφοράς (**βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα**)

συσκευή μεταφοράς (*Bio-Rad*)

3mm χαρτί διήθησης Whatman

μεμβράνη μεταφοράς, 0,45 μm νιτροκυτταρίνη (*Millipore*)

τροφοδοτικό σταθερής παροχής

διάλυμα δέσμωσης μη-ειδικών θέσεων (**βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα**)

πρωτογενές αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει

TBST (**βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα**)

δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με την υπεροξειδάση του μαύρου ραπανιού (HRPO) (*Jackson Immunoresearch Lab*)

υπόστρωμα χημιοφωταύγειας (enhanced chemiluminescent substrate, ECL, *Pierce*)

18cm x 24cm μπλε φιλμ ακτίνων X (*Kodak*)

μεταλλική κασέτα για φιλμ

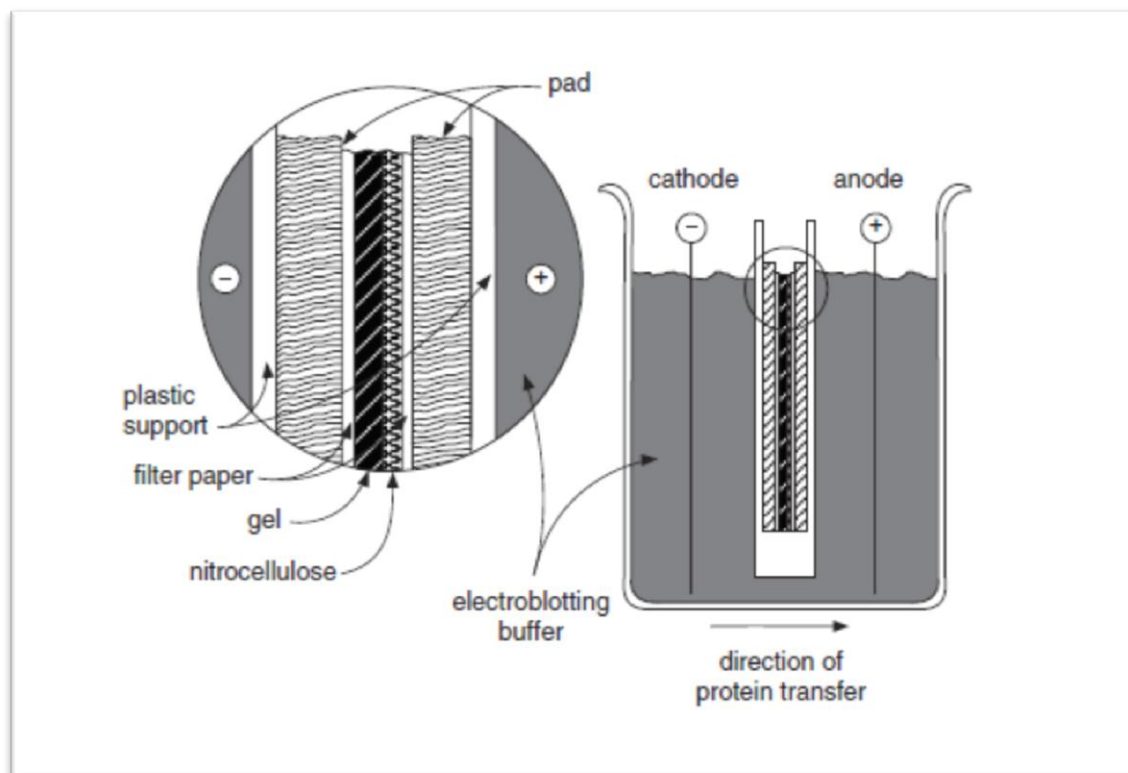
developer (*Kodak*)

fixer (*Kodak*)

1. Η γέλη, η νιτροκυτταρίνη και το χαρτί διήθησης εξισορροπούνται στο διάλυμα μεταφοράς.
2. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, συγκροτείται η κασέτα της μεταφοράς όπως φαίνεται στην **Εικόνα 29**. Από την αποδιατακτική γέλη απομακρύνεται το πήκτωμα επιστοιβάξης.
3. Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών, η μεμβράνη επώαζεται στο διάλυμα δέσμωσης των μη-ειδικών θέσεων για 30 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα υπό ανάδευση.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα για την GSH στις πρωτεΐνες (101-A, *Virogen, Watertown, MA*), την GRX1 (*ABNOVA*), τη β-ακτίνη (*Sigma*), το GAPDH (*Chemicon*) και το FLAG επίτοπο (*Santa Cruz*) χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώσεις 1:1000, 1:500, 1:5000, 1:2000 και 1:300 σε TBST, αντίστοιχα, για 18 ώρες στους 4°C. Τα πολυκλωνικά αντισώματα για τους IRF3, STAT1 και CBP (*Santa Cruz*) χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:300 σε TBST για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αντισώματα για τις φωσφο-p42/44 MAPK, p42/44 MAPK, φωσφο-p70S6K (Thr421/Ser424) και p70S6K (*Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA*) και τον HIF-1α (*BD Biosciences, Heidelberg, Germany*) χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:1000 σε TBST για 18 ώρες στους 4°C. Τα αντισώματα για τους TRAF6, TRAF2 και HA επιτόπους (*Santa Cruz*) χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:300 σε TBST για 18 ώρες στους 4°C.

5. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνεται με τρεις επώσεις σε TBST (15 λεπτά/πλύση).
6. Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα σε αραιώση 1:40.000 σε TBST για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
7. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνεται με τρεις επώσεις σε TBST (15 λεπτά/πλύση).
8. Για 1' η μεμβράνη καλύπτεται με ECL.



**Εικόνα 29. Συγκρότηση «κασέτας» μεταφοράς.**

Η γέλη πολυακρυλαμίδης που περιέχει τις πρωτεΐνες τοποθετείται πάνω σε χαρτί διήθησης. Στην άλλη περιοχή της γέλης τοποθετείται νιτροκυτταρίνη, η οποία εν συνεχεία καλύπτεται με ένα ακόμα χαρτί διήθησης. Τα χαρτιά διήθησης που περιέχουν τη γέλη και τη μεμβράνη τοποθετούνται ανάμεσα στα σφουγγαράκια. Αυτό το «σάντουιτς» τοποθετείται σε μία πλαστική υποστήριξη και ολόκληρη η κατασκευή σε ένα δοχείο που περιέχει διάλυμα μεταφοράς. Για τη μεταφορά των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών, η μεμβράνη τοποθετείται στην ανοδική πλευρά της γέλης. Οι φορτισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται ηλεκτροφορητικά από τη γέλη στη μεμβράνη. Η μεταφορά επιτυγχάνεται εφαρμόζοντας τάση 100 V για 1 με 2 hr.

**9.** Με χαρτί διήθησης Whatman στεγνώνουμε τη μεμβράνη και την τυλίγουμε σε πλαστική μεμβράνη.

*Για τη βελτιστοποίηση της εικόνας, μόνο ένα στρώμα πλαστικού πρέπει να υπάρχει ανάμεσα στη μεμβράνη και στο φιλμ. Η υγρασία δεν πρέπει να έρθει σε επαφή με το φιλμ.*

**10.** Σε σκοτεινό δωμάτιο, η μεμβράνη τοποθετείται πάνω στο φιλμ.

**11.** Το φιλμ εκτίθεται για χρονικό διάστημα από λίγα δευτερόλεπτα ως 1-2 ώρες.

### **αντιδραστήρια και διαλύματα**

#### **διάλυμα μεταφοράς**

0,125 M Tris base (*Sigma-Aldrich*)

0,96 M γλυκίνη (*Sigma-Aldrich*)

20% μεθανόλη (*Sigma-Aldrich*)

H<sub>2</sub>O

**διάλυμα δέσμευσης μη-ειδικών θέσεων**

5% BSA σε TBST

**TBS**100 mM Tris·Cl, pH 7,5 (*Sigma-Aldrich*)0,9% (150 mM) NaCl (*Sigma-Aldrich*)**TBST**0,1% Tween-20 σε TBS (*Sigma-Aldrich*)**2.10 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ-DNA**

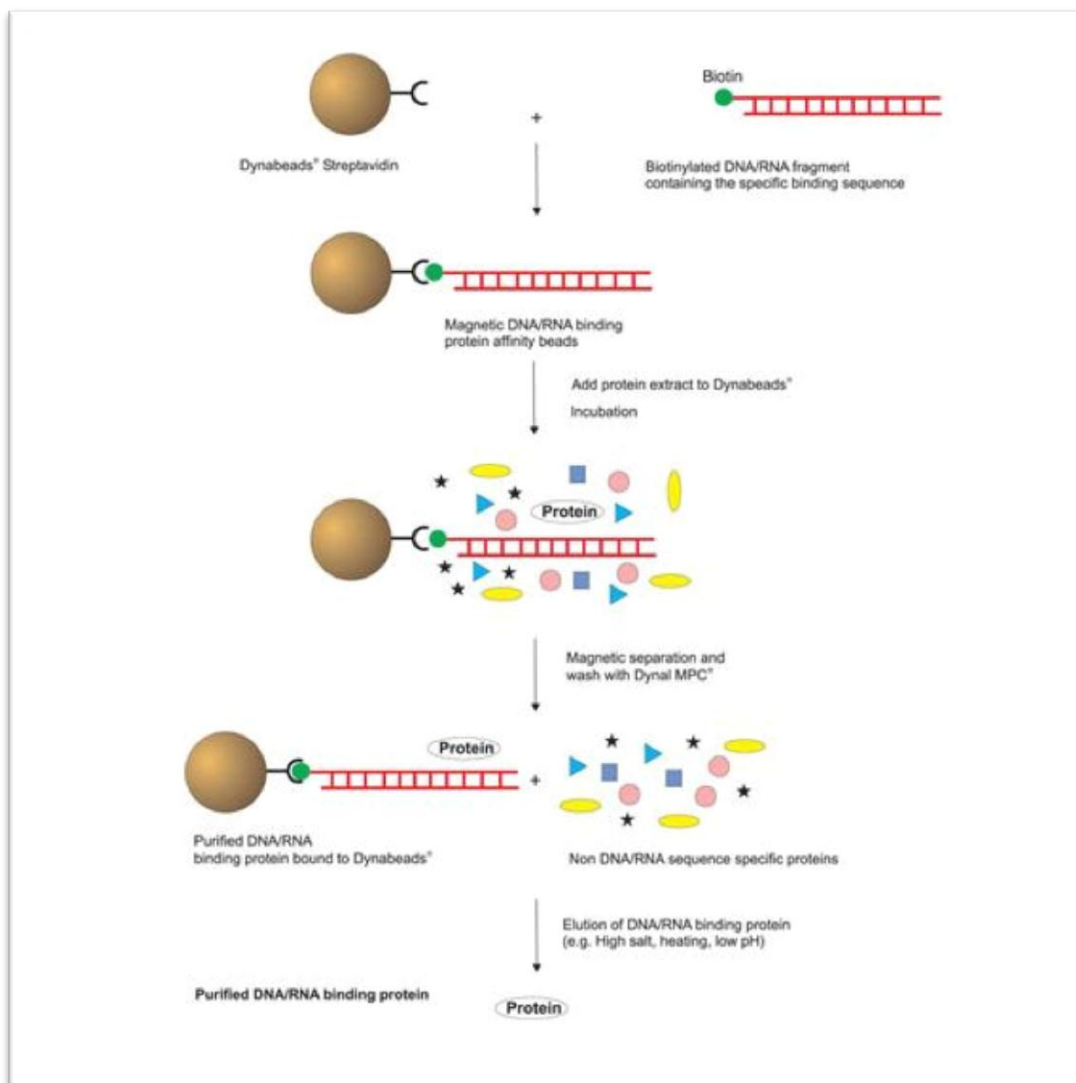
Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα στρεπταβιδίνης/βιοτίνης, το οποίο βασίζεται στο ισχυρό και ουσιαστικά αδιάσπαστο σύμπλοκο που σχηματίζουν τα δύο παραπάνω μόρια. Κατά τη διαδικασία αυτή παρασκευάζεται ένα τμήμα DNA που περιέχει μία θέση πρόσδεσης υψηλής συγγένειας για την πρωτεΐνη-στόχο και στη συνέχεια ένα μόριο βιοτινυλιωμένου νουκλεοτιδίου ενσωματώνεται σε ένα από τα άκρα του παραπάνω τμήματος. Το τμήμα αυτό προσδένει μέσω της βιοτίνης σε σφαιρίδια που είναι συζευγμένα με στρεπταβιδίνη. Κατόπιν, η πρωτεΐνη-στόχος δένει στο DNA, Οι πρωτεΐνες που δεν προσδέχονται απομακρύνονται με πλυσίματα, ενώ η έκλυση της προσδεμένης πρωτεΐνης μπορεί να γίνει με θέρμανση, χαμηλό pH, υψηλή αλατότητα κ.ά. (**Εικόνα 30**).

Πειραματική πορεία**Υλικά**μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (*Dynal*)διάλυμα πρόσδεσης A (**βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα**)διάλυμα πρόσδεσης B (**βλ. αντιδραστήρια και διαλύματα**)5x SDS διάλυμα (**βλ. ενότητα 2.8.2**)διαλύματα για ηλεκτροφόρηση και ανοσοτύπωση κατά Western (**βλ. ενότητα 2.9**)βιοτινυλιωμένα και μη- ολιγονουκλεοτίδια (*Invitrogen*)

Bio-ISRE από τον ISG15 υποκινητή: Βιοτίνη-CATGCCTCGGGAAAGGGAAACCGAAACTGAAGCC (Lin R et al., 1998)

ISRE: CATGCCTCGGGAAAGGGAAACCGAAACTGAAGCC (Lin R et al., 1998)

Μεταλλαγμένο ISRE: GGCGGGATCGGGACACCGACACTGAA



Εικόνα 30: Αρχή της μεθόδου για τη μελέτη της πρόσδεσης πρωτεΐνης-DNA.

### 2.10.1 Ακίνητοποίηση των νουκλεϊκών οξέων

1. Η αναδιάταξη των δύο κλώνων DNA πραγματοποιείται όπως περιγράφεται στην **Ενότητα 2.4.1**.
2. Τα μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης εξισορροπούνται στο διάλυμα πρόσδεσης A.
3. Το βιοτινυλιωμένο DNA (σε H<sub>2</sub>O) επωάζεται με τα εξισορροπημένα σφαιρίδια για 20' σε θερμοκρασία δωματίου με περιστροφή.
4. 2-3 πλύσεις των σφαιριδίων με το διάλυμα πρόσδεσης A.
5. Επαναιώρηση των σφαιριδίων στο διάλυμα πρόσδεσης A. Η πρόσδεση έχει ολοκληρωθεί.

### 2.10.2 Προετοιμασία της αντίδρασης πρόσδεσης

6. Τα πυρηνικά κυτταρικά εκχυλίσματα ετοιμάζονται όπως αναφέρεται στην προηγούμενη ενότητα (**Ενότητα 2.7.1**).



7. Ως control για την ειδικότητα της πρόσδεσης, ίσες ποσότητες εκχυλισμάτων επωάζονται με το δίκλωνο μη-βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο (σε 50 φορές περίσσεια) ή με το μεταλλαγμένο δίκλωνο μη-βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο στο διάλυμα πρόσδεσης B για 10' στον πάγο.

### 2.10.3 Πρόσδεση πρωτεΐνης-DNA

8. Ίσες ποσότητες σφαιριδίων προσδεδεμένων στο ολιγονουκλεοτίδιο προστίθενται σε όλα τα δείγματα. Επίσης σε ένα δείγμα-control προστίθενται άδεια σφαιρίδια (χωρίς το ολιγονουκλεοτίδιο). Επάση για 20' σε θερμοκρασία δωματίου.

9. 4-5 πλύσεις των σφαιριδίων με το διάλυμα πρόσδεσης B.

10. Η έκλυση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε 1x SDS διάλυμα στους 100°C για 5'.

11. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση και ανοσοτύπωση κατά Western όπως περιγράφεται στην **Ενότητα 2.9** με αντισώματα ενάντια στον IRF3 και το GSH.

### αντιδραστήρια και διαλύματα

#### διάλυμα πρόσδεσης A

1M NaCl (*Sigma-Aldrich*)

5mM Tris-HCl, pH 7,5 (*Sigma-Aldrich*)

0,5mM EDTA, pH 8,0 (*Sigma-Aldrich*)

#### διάλυμα πρόσδεσης B

100mM Tris-HCl, pH 7,5 (*Sigma-Aldrich*)

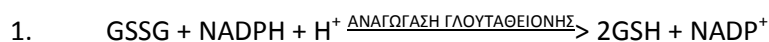
10mM EDTA, pH 8,0 (*Sigma-Aldrich*)

50% γλυκερόλη (*Sigma-Aldrich*)

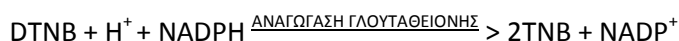
2 mg/ml poly dI/dC (*Sigma-Aldrich*)

### 2.11 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ

Η μέτρηση της γλουταθειόνης (GSH) περιλαμβάνει μία δοκιμασία κινητικής στην οποία καταλυτικές ποσότητες (nmoles) GSH προκαλούν μία συνεχή μείωση του 5,5'-dithiobis (2-nitobenzoic acid) (DTNB) σε 5-thio-2-nitobenzoic acid (TNB), ενώ το GSSG που σχηματίζεται ανακυκλώνεται μέσω της αναγωγής της γλουταθειόνης και NADPH.



Η συνολική αντίδραση:



GSSG/GSH

Ο ρυθμός της αντίδρασης είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης ως τα 2 μM. Το κίτρινο προϊόν, το TNB, μετράται φωτομετρικά στα 412 nm. Η μέθοδος χρησιμοποιεί μία πρότυπη καμπύλη ανηγμένης γλουταθειόνης προκειμένου να προσδιορίσει την ποσότητα της γλουταθειόνης στο βιολογικό δείγμα.

Πειραματική πορεία**Υλικά**

96άρια τρυβλία (*Greiner Bio-One*)  
 φωτόμετρο που να δέχεται 96άρια τρυβλία  
 Glutathione Assay Kit (*Sigma*)

**2.11.1 Παρασκευή δείγματος**

Για καλύτερα αποτελέσματα το δείγμα πρέπει να είναι φρέσκο

1. Πλύσιμο  $\sim 10^7$  κυττάρων με PBS και επαναδιάλυση σε PBS.
2. Φυγοκέντρηση στα 600g και απομάκρυνση του υπερκευμένου.
3. Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 3 όγκους 5% TCA.
4. Πάγωμα και ξεπάγωμα 2 φορές.
5. 5' στους 4 °C
6. Φυγοκέντρηση στις 10.000 g για 10'.
7. Για τη μέτρηση της γλουταθειόνης ενδέχεται να χρειαστεί αρραίωση (έως 20 φορές), ώστε να βρίσκεται το δείγμα στο όριο ανίχνευσης.

*Εάν η διαδικασία δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί άμεσα (δλδ. μέσα σε 2 ώρες), το εκχύλισμα μπορεί να διατηρηθεί στους -70 °C για περίπου 10 ημέρες.*

**2.11.2 Διαδικασία**

1. Παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων γλουταθειόνης με σειριακή αρραίωση όπως φαίνεται στον **Πίνακα 13**.

<b>Πίνακας 13. Πρότυπη καμπύλη για τη μέτρηση γλουταθειόνης</b>					
«Πηγάδι»	1	2	3	4	5
<b>Συγκέντρωση GSH (μM)</b>	50,000	25,000	12,500	6,250	3,125
<b>50μM Διάλυμα GSH (μl)</b>	50	25 (από το «πηγάδι» 1)	25 (από το «πηγάδι» 2)	25 (από το «πηγάδι» 3)	25 (από το «πηγάδι» 4)
<b>5% TCA (μl)</b>	Καθόλου	25	25	25	25
<b>nmoles GSH σε ένα δείγμα 10 μl</b>	0,5000	0,2500	0,1250	0,0625	0,0312

2. Το φωτόμετρο ρυθμίζεται στα 412 nm και να παίρνει μετρήσεις ανά 1' για 5'.
3. Οι αντιδράσεις παρασκευάζονται βάσει του **Πίνακα 14**. Κάθε δοκιμασία γίνεται εις διπλούν.

Πίνακας 14. Αντιδράσεις				
Δείγμα που μετράται	Όγκος δείγματος μl	5% SSA μl	Όγκος μίγματος-εργασίας μl	NADPH (0,16mg/ml) μl
Τυφλό	-	10	150	50
Πρότυπη καμπύλη (διάφορες αραιώσεις)	10	-	150	50
Άγνωστο δείγμα	x	10-x	150	50

### 2.11.3 Υπολογισμοί

Με τη χρήση των τιμών των πρότυπων διαλυμάτων γλουταθειόνης μπορεί να καθοριστεί η πρότυπη καμπύλη και να υπολογιστεί το  $\Delta A_{412}/\lambda\epsilon\pi\tau\acute{o}$  που ισοδυναμεί με 1 nmole ανηγμένης γλουταθειόνης ανά «πηγαδάκι».

Τα nmoles της GSH στο άγνωστο δείγμα υπολογίζονται ως εξής:

$$\text{nmoles GSH/mL δείγματος} = \frac{\Delta A_{412}/\lambda\epsilon\pi\tau\acute{o}(\text{δείγμα})}{\Delta A_{412}/\lambda\epsilon\pi\tau\acute{o}(1 \text{ nmole})} \times \text{αραιώση}$$

$$\Delta A_{412}/\lambda\epsilon\pi\tau\acute{o}(1 \text{ nmole}) \times \text{όγκο}$$

**$\Delta A_{412}/\lambda\epsilon\pi\tau\acute{o}(\text{δείγμα})$**  = η κλίση που προκύπτει από το δείγμα (αφού αφαιρέσουμε τις τιμές που δίνει η αντίδραση του τυφλού).

**$\Delta A_{412}/\lambda\epsilon\pi\tau\acute{o}(\text{δείγμα})$**  = η κλίση που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη για 1 nmole GSH

**Αραιώση** = ο παράγοντας αραιώσης του αρχικού δείγματος

**Όγκος** = ο όγκος του δείγματος στην αντίδραση σε mL

#### αντιδραστήρια και διαλύματα

##### **DTNB διάλυμα-στοκ**

1,5 mg DTNB/ml DMSO (*Sigma-Aldrich*)

Το διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί σε κλάσματα στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 3 μήνες.

##### **NADPH διάλυμα-στοκ**

40 mg/ml  $\text{H}_2\text{O}$  (*Sigma-Aldrich*)

Το διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 6 μήνες.

##### **5-Sulfosalicylic Acid (SSA) Διάλυμα**

5% w/v σε  $\text{H}_2\text{O}$  (*Sigma-Aldrich*)

Διατηρείται στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

##### **Glutathione (GSH) Standard διάλυμα-στοκ**

10 mM σε  $\text{H}_2\text{O}$  (*Sigma-Aldrich*)

Το διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 3 μήνες.

**1X διάλυμα δοκιμασίας**

100mM φωσφορικό κάλιο pH 7,0 (*Sigma-Aldrich*)

1mM EDTA (*Sigma-Aldrich*)

**διάλυμα αναγωγάσης της γλουταθειόνης**

6 units/ml διαλύματος δοκιμασίας

**διάλυμα NADPH**

0,16 mg/ml διαλύματος δοκιμασίας

**μίγμα εργασίας (8 ml)**

8 ml 1X διάλυμα δοκιμασίας,

228 μl διαλύματος αναγωγάσης της γλουταθειόνης (6 units/ml)

228 μl διαλύματος-στοκ DTNB (1,5 mg/ml)

Το διάλυμα αυτό μπορεί να διατηρηθεί για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

**αποτελέσματα**



### 3.1 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ TRX ΡΥΘΜΙΖΕΙ ΤΗ ΝΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ HIF-1α

Ο HIF-1, ο οποίος αποτελείται από δύο υπομονάδες τις HIF-1α και HIF-1β, αποτελεί κύριο ρυθμιστή για την προσαρμογή σε χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου, δηλαδή στην υποξία. Σε αντίθεση με τη συνεχώς εκφραζόμενη HIF-1β υπομονάδα, η HIF-1α ρυθμίζεται από την υποξία, αλλά και υπό φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου (21% O<sub>2</sub>) από διάφορα ερεθίσματα, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε πώς οι TRX2 και TRXR2 επηρεάζουν τη συσσώρευση της HIF-1α και την ικανότητα του HIF-1 για *trans* ενεργοποίηση που προκαλεί το NO σε HEK293 κύτταρα.

#### 3.1.1 Οι TRX2/TRXR2 και TRX1, η συσσώρευση της HIF-1α και η ενεργότητα του HIF-1

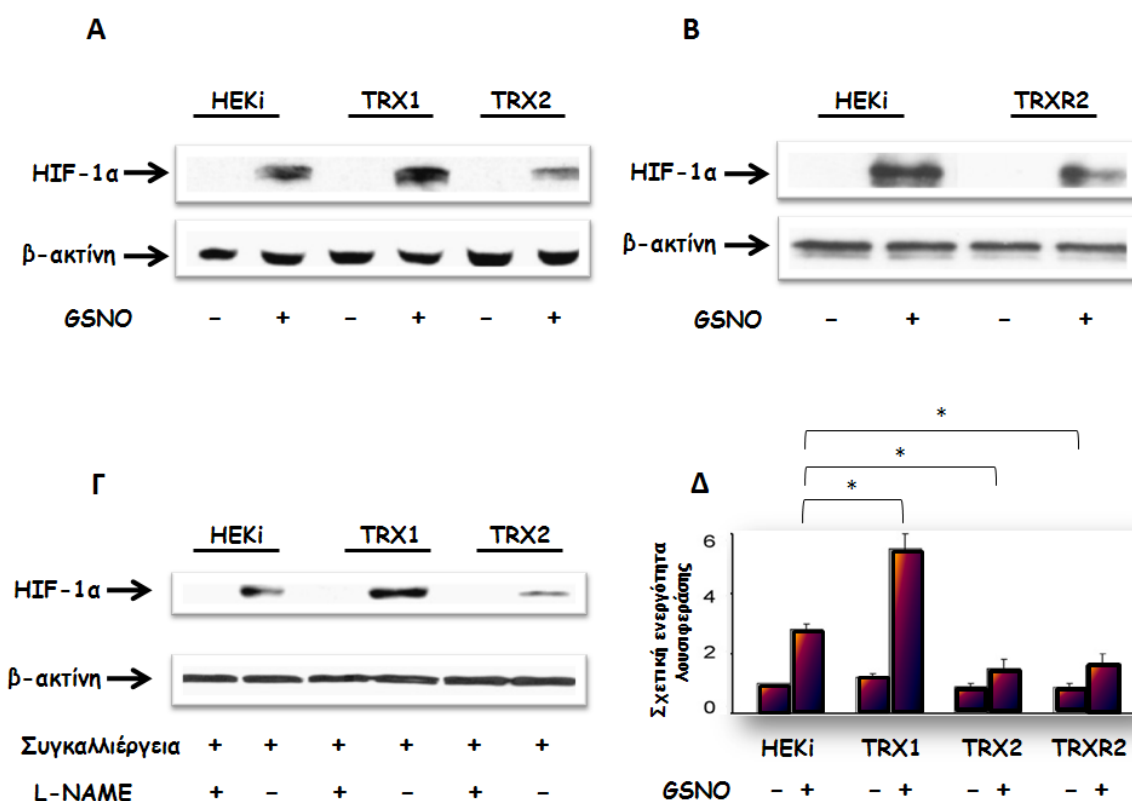
Χρησιμοποιήσαμε HEK κύτταρα σταθερά επιμολυσμένα με τις TRX1, TRX2, TRXR2 ή με έναν πλασμιδιακό φορέα-μάρτυρα (HEKi) (Zhou J et al., 2007). Όπως ήταν αναμενόμενο, η έκθεση των HEKi κυττάρων για 2 h σε 0,5 mM GSNO αυξάνει την ποσότητα της HIF-1α πρωτεΐνης σε σύγκριση με τα μη-διεγερμένα κύτταρα. Η ικανότητα του GSNO να αυξάνει τη HIF-1α είναι πιο έντονη στα επιμολυσμένα με την TRX1 κύτταρα σε σύγκριση με τα HEKi, αλλά είναι σημαντικά μικρότερη στα επιμολυσμένα με τις TRX2 ή TRXR2 κύτταρα (**Εικόνες 31A και B**). Οπότε, η υπερέκφραση είτε της TRX2 είτε της αναγωγάσης της, δηλαδή της TRXR2, εξασθενεί την ικανότητα του NO να σταθεροποιεί τη HIF-1α.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε ένα σύστημα συγκαλλιέργειας, το οποίο επιτρέπει την παραγωγή NO από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα ποντικού RAW267.4 και με αυτόν τον τρόπο μπορέσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση του ενδογενώς παραγόμενου NO στη συσσώρευση της HIF-1α στα HEK κύτταρα. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από τα πειράματα με το GSNO, το ενδογενώς παραγόμενο NO ενεργοποιεί τη συσσώρευση της HIF-1α στα HEKi. Η απόκριση είναι πιο έκδηλη στα TRX1-κύτταρα και μειωμένη στα TRX2 σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (**Εικόνα 31Γ**). Η

**S-Nitrosoglutathione, GSNO**  
(C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S): Ένας χρήσιμος δότης NO, ο οποίος αυθόρμητα απελευθερώνει NO υπό φυσιολογικές συνθήκες (Mathews WR and Kerr SW, 1993).

παρουσία του αναστολέα της NO-συνθετάσης, L-NAME, στη συγκαλλιέργεια των μακροφάγων με τα HEK κύτταρα οδηγεί στην πλήρη καταστολή της συσσώρευσης της HIF-1α. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το ενδογενώς παραγόμενο NO φτάνει σε συγκεντρώσεις αρκετά υψηλές για να σταθεροποιηθεί η HIF-1α, υπογραμμίζοντας έτσι την (παθο)φυσιολογική ικανότητα του NO να επηρεάζει τη συσσώρευση της HIF-1α.

Για να εξετάσουμε τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, χρησιμοποιήσαμε ένα σύστημα πλασμιδίου αναφοράς που βασίζεται στο HRE (στοιχείο που αποκρίνεται στο HIF). Η χορήγηση 0,5 mM GSNO για 16 h επάγει την ενεργότητα του HRE-πλασμιδίου αναφοράς στα HEKi κύτταρα. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης ενισχύεται ακόμα περισσότερο στα TRX1-κύτταρα, ενώ μειώνεται ουσιαστικά στα TRX2- και TRXR2 κύτταρα (**Εικόνα 31Δ**).



**Εικόνα 31.** Έκφραση της HIF-1α σε κύτταρα που υπερεκφράζουν TRX1, TRX2 ή TRXR2.

(A, B) Χορηγήθηκε 0,5 mM GSNO για 2 h σε HEK κύτταρα επιμολυσμένα με τον άδειο φορέα (HEKi) και σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την TRX1, την TRX2 ή την TRXR2. Ανοσοσύτωση κατά Western των HIF-1α και β-ακτίνη. (Γ) Οι παραπάνω κυτταρικές σειρές συγκαλλιεργήθηκαν με LPS/IFN $\gamma$  ενεργοποιημένα RAW267.4 για 8 h παρουσία ή απουσία 1 mM L-NAME. Ανοσοσύτωση κατά Western των HIF-1α και β-ακτίνη. (Δ) HEKi, TRX1-, TRX2- ή TRXR2-κύτταρα επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς pHRE-Luc και επώαστηκαν παρουσία ή απουσία 0,5 mM GSNO για 16 h. Μετά την κυτταρική λύση, οι ενεργότητες της λουσιφεράσης μετρήθηκαν και κανονικοποιήθηκαν. Οι τιμές της λουσιφεράσης εκφράζονται ως ο μέσος όρος $\pm$ s.d. από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα. \* $p < 0,05$ .

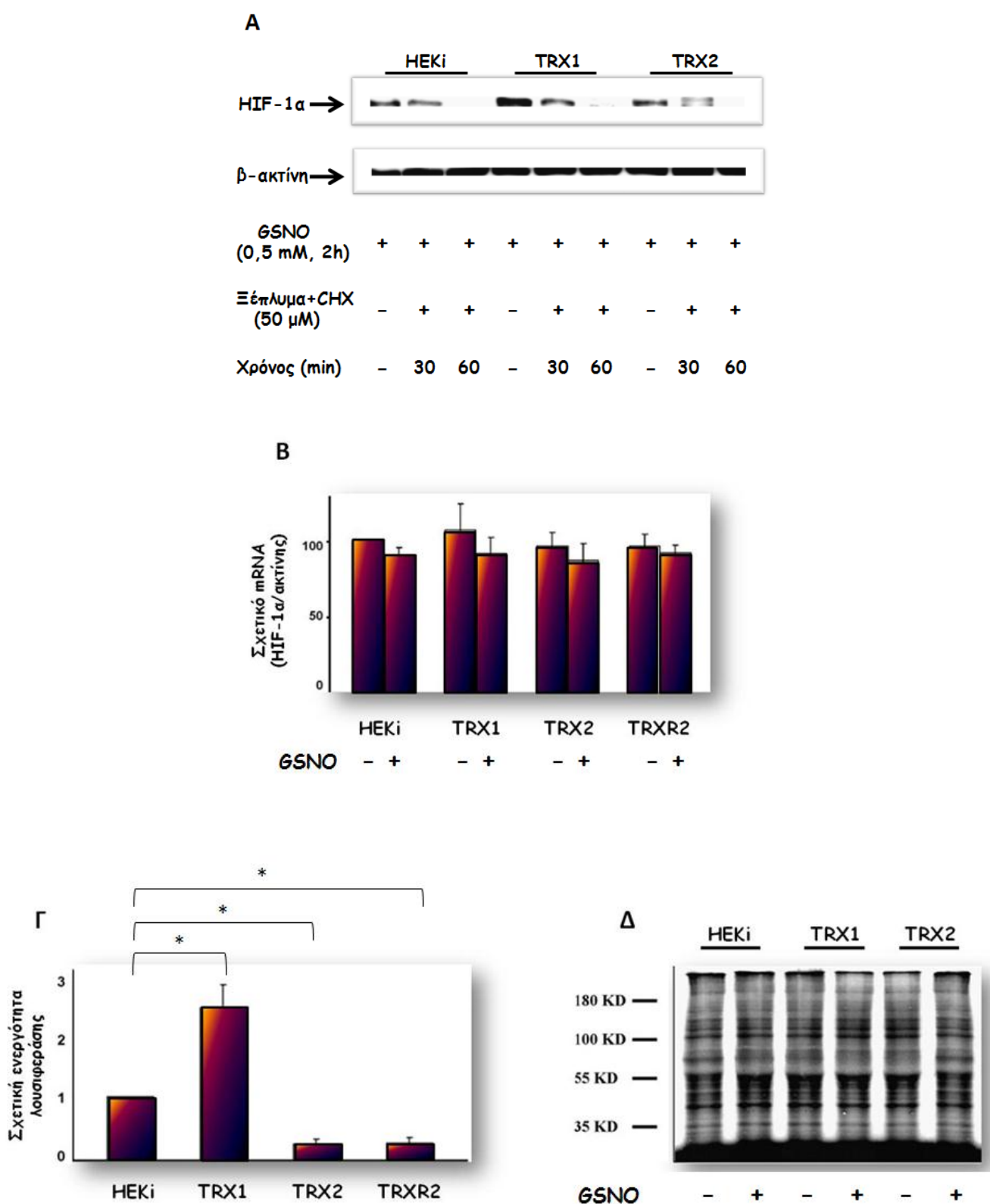
### 3.1.2 Η TRX1 και η TRX2/TRXR2 ρυθμίζουν διαφορετικά τη μετάφραση της HIF-1α

Η ρύθμιση του ποσού της HIF-1α πρωτεΐνης μπορεί να γίνει είτε ενισχύοντας την πρωτεϊνοσύνθεση είτε αναστέλλοντας την αποικοδόμηση μέσω του πρωτεοσώματος. Αφού έχει αποδειχθεί ότι το NO έχει την ικανότητα που έχει και η υποξία, δηλαδή μειώνει την αποικοδόμηση της HIF-1α, εξετάσαμε εάν η διαδικασία αυτή επηρεάζεται και από τις θειορεδοξίνες. HEKi, TRX1- και TRX2-κύτταρα επώαστηκαν με 0,5 mM GSNO για 2 h, ώστε να συσσωρευτεί η HIF-1α (Εικόνα 32A). Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το GSNO και προστέθηκε κυκλοεξαμίδιο για να αναστείλει την πρωτεϊνοσύνθεση. Η προ-συσσωρευμένη HIF-1α άρχισε να μειώνεται μετά από 30 min και μέσα σε 60 min είχε εξαφανιστεί. Δεν υπήρξαν διαφορές στο ρυθμό αποσύνθεσης ανάμεσα στα κύτταρα μάρτυρες και στις σταθερά επιμολυσμένες κυτταροσειρές. Από τη στιγμή που δεν παρατηρήσαμε διαφορά στην αποικοδόμηση της HIF-1α, θεωρήσαμε ότι η διαφορετική επίδραση των TRX1 και TRX2/TRXR2 στη HIF-1α πρωτεΐνη



προέρχεται από διαφοροποιήσεις στην πρωτεϊνοσύνθεση. Η ιδέα αυτή ενισχύεται από τα όμοια επίπεδα του mRNA της HIF-1α που ανιχνεύονται στα TRX1-, TRX2- και TRXR2-κύτταρα (**Εικόνα 32B**). Για να αποδείξουμε την υπόθεση του ελέγχου της μετάφρασης, χρησιμοποιήσαμε ένα πλασμίδιο αναφοράς που φέρει έναν μονίμως ενεργό SV40 υποκινητή, ώστε να μελετήσουμε την πρωτεϊνική μετάφραση που εξαρτάται από το κάλυμμα (cap-dependent translation) στις διαφορετικά σταθερά επιμολυσμένες κυτταροσειρές. Ενώ η υπερέκφραση της TRX1 αύξησε την εξαρτώμενη από το κάλυμμα ενεργότητα της λουσιφεράσης, οι TRX2 και TRXR2 μείωσαν την ενεργότητα αυτή κάτω από τα επίπεδα του μάρτυρα (**Εικόνα 32Γ**). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι TRX1 και TRX2/TRXR2 ελέγχουν τα επίπεδα της HIF-1α μέσω ενός μηχανισμού που σχετίζεται με τη μετάφραση που εξαρτάται από το κάλυμμα. Για να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο να επηρεάζεται η ρύθμιση της μετάφρασης της HIF-1α από αλλοιώσεις στον ολικό ρυθμό της πρωτεϊνοσύνθεσης, πραγματοποιήσαμε ένα πείραμα σήμανσης με [35S] μεθειονίνη. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 32Δ**, ούτε οι TRX1, TRX2 ούτε το NO επηρεάζουν τη συνολική πρωτεϊνική μετάφραση, που σημαίνει ότι οι θειορεδοξίνες επιλεκτικά ρυθμίζουν τη μετάφραση της HIF-1α.

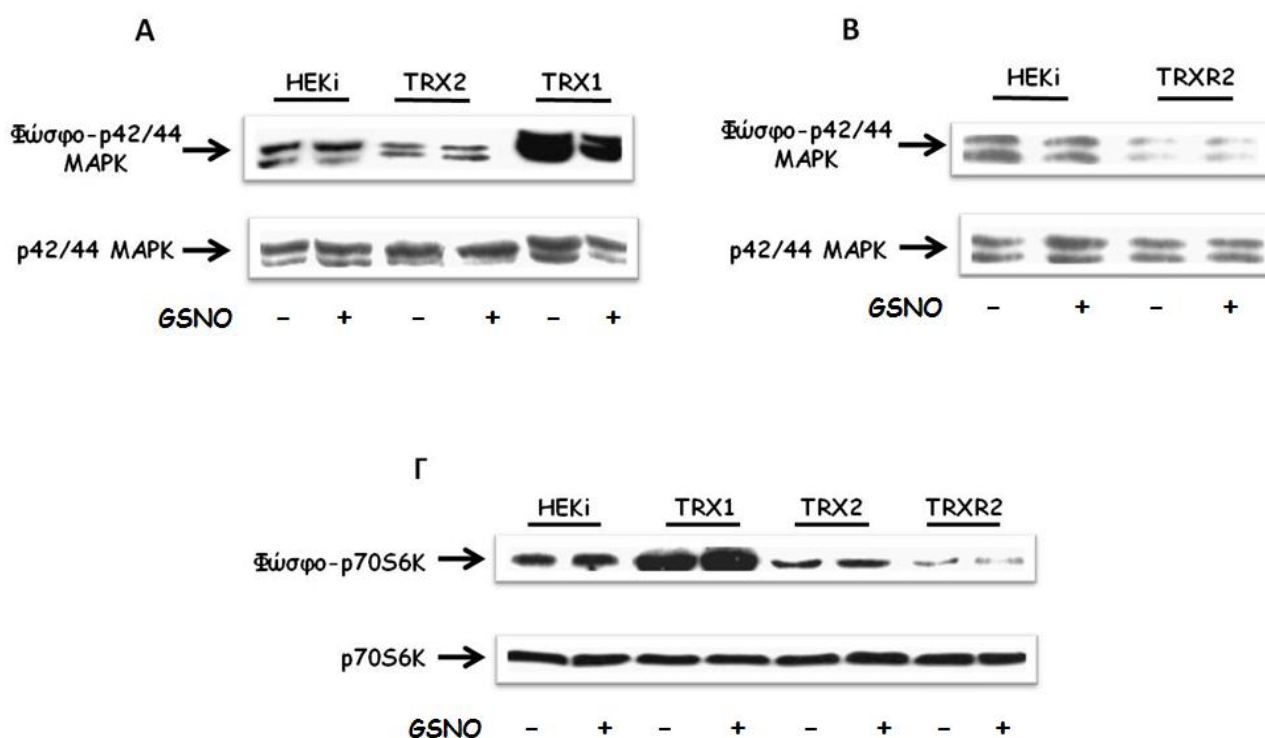
Για να διερευνήσουμε πώς οι TRX1, TRX2 και TRXR2 επιδρούν στη μετάφραση της HIF-1α, μελετήσαμε τη φωσφορυλίωση της p42/44 MAPK, η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση της μετάφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Η φωσφορυλίωση της κινάσης αυτής δεν επηρεάζεται από την προσθήκη 0,5 mM GSNO (για 2 h), ωστόσο είναι πιο έντονη στα TRX1-κύτταρα (**Εικόνα 33A**). Από την άλλη, το ποσό της φώσφο-p42/44 MAPK μειώνεται σημαντικά στα TRX2- και TRXR2-κύτταρα (**Εικόνες 33A και B**). Η δράση των θειορεδοξινών στην p42/44 MAPK επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια με τον έλεγχο της φωσφορυλίωσης της p70S6K, που αποτελεί καταρροϊκό στόχο της p42/44 MAPK και αποδεδειγμένη κινάση ελέγχου της μετάφρασης. Πράγματι, η φωσφορυλίωσή της παρουσιάζει σημαντική μείωση στα TRX2- και TRXR2-κύτταρα, ενώ αυξάνει στα TRX1 (**Εικόνα 33Γ**). Λαμβάνοντας υπόψη ότι το συνολικό ποσό της MAPK ή της p70S6K παραμένει αναλλοίωτο, είναι πιθανό η ενεργότητα της πρώτης να ενισχύεται από την TRX1 και να μειώνεται από την TRX2 ή την TRXR2.



Εικόνα 32. Μετάφραση της HIF-1α υπό τον έλεγχο των TRX1 ή TRX2/TRXR2.

(A) HEK κύτταρα επιμολυσμένα με τον άδειο φορέα (HEKi) και κύτταρα που υπερεκφράζουν την TRX1 ή την TRX2 επωάστηκαν με 0,5 mM GSNO για 2 h. Στη συνέχεια ξεπλύνουμε τα κύτταρα και προσθέσαμε φρέσκο θρεπτικό με 50 μM κυκλοεξαμίδιο (CHX). Οι επωάσεις συνεχίστηκαν για 30

ή 60 min και με ανοσοσύτρωση κατά Western ανιχνεύτηκαν οι HIF-1α και ακτίνη. **(B)** HEK1, TRX1-, TRX2- ή TRXR2-κύτταρα επώαστηκαν είτε σε φυσιολογικές συνθήκες ή με 0,5 mM GSNO για 2 h. Κατόπιν συλλέξαμε τα κύτταρα για να μετρήσουμε το mRNA του HIF-1α και της ακτίνης με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου. **(Γ)** HEK1, TRX1-, TRX2- ή TRXR2-κύτταρα επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς pCap-Luc και επώαστηκαν με 0,5 mM GSNO για 16 h. Μετά την κυτταρική λύση οι ενεργότητες της λουσιφεράσης μετρήθηκαν και κανονικοποιήθηκαν. **(Δ)** HEK1, TRX1- ή TRX2-κύτταρα σημάνθηκαν με [35S]μεθειονίνη και επώαστηκαν με 0,5 mM GSNO ή διατηρήθηκαν ως μάρτυρες για 2 h, όπως περιγράφεται στις πειραματικές διαδικασίες. Αναλύθηκαν 100 μg από κάθε δείγμα με 10% SDS-PAGE και οπτικοποιήθηκαν με αυτοραδιογραφία. Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Τα επίπεδα mRNA και οι τιμές ενεργότητας λουσιφεράσης είναι οι μ.ό.  $\pm$ s.d. από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα. \* $p < 0,05$ .

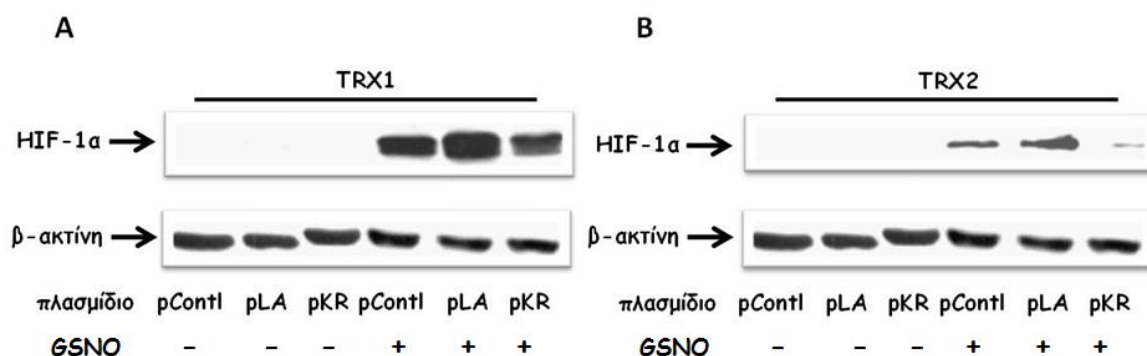


**Εικόνα 33. Φωσφορυλίωση των p42/44 MAPK και p70S6K υπό τον έλεγχο της TRX1 ή των TRX2/TRXR2.**

Πραγματοποιήθηκε ανοσοσύτρωση κατά Western σε HEK1, TRX1-, TRX2-, TRXR2-κύτταρα για να ανιχνευθεί η **(A, B)** φώσφο- p42/44 MAPK σε σχέση με τη συνολική p42/44 MAPK πρωτεΐνη ή **(Γ)** η φώσφο- p70S6K (Thr421/Ser424) σε σχέση με τη συνολική p70S6K με ή χωρίς έκθεση σε 0,5 mM GSNO για 2 h. Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Προκειμένου να αξιολογήσουμε την ιδέα ότι οι παραπάνω αλλαγές στην ενεργότητα της MAPK οδηγούν και σε αλλαγές στην ποσότητα της HIF-1α, επιμολύναμε τα TRX1- και TRX2-κύτταρα με πλασμίδια με μία μονίμως ενεργή (pLA) ή ανενεργή (pKR) μεταλλαγμένη μορφή της MAPK και μελετήσαμε τη συμπεριφορά τους μετά την επώαση με GSNO. Στα TRX1-κύτταρα, η ενεργή p44 μεταλλαγμένη πρωτεΐνη οδηγεί σε μία μικρή αύξηση στη HIF-1α, ενώ η ανενεργή σε μία μικρή

μείωση (**Εικόνα 34A**). Πιο emphaticά, η εξαναγκασμένη ενεργοποίηση της p44 MAPK επέτρεψε τη σημαντική συσσώρευση της HIF-1α στα TRX2-κύτταρα σε σύγκριση με την ελαττωμένη ποσότητα που παρατηρείται στα αντίστοιχα TRX2-κύτταρα-μάρτυρες. Η επιμόλυνση με την ανενεργή MAPK μορφή, εξασθενεί ακόμα περισσότερο την ικανότητα του GSNO να αυξάνει τα επίπεδα της HIF-1α (**Εικόνα 34B**). Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η αποκατάσταση της ενεργότητας της MAPK στα TRX2-κύτταρα επαναφέρει την απόκριση της HIF-1α στο NO.

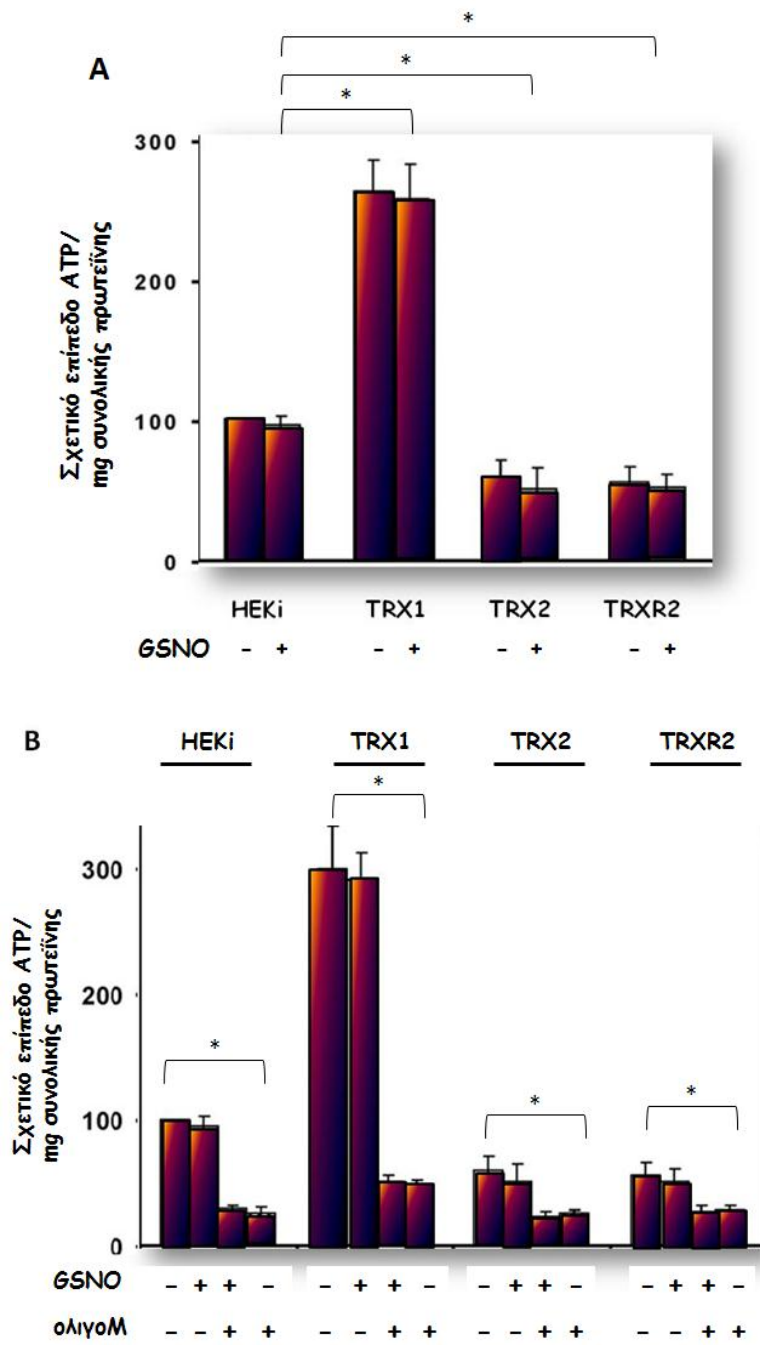


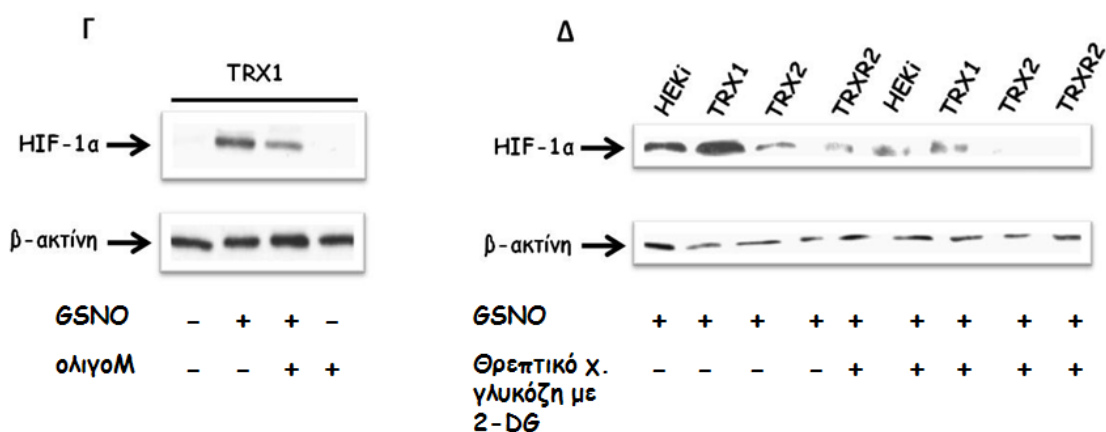
**Εικόνα 34.** Αύξηση της συσσώρευσης της HIF-1α με επιμόλυνση ενεργής p44 MAPK σε TRX1- ή TRX2-κύτταρα.

(A) TRX1- ή (B) TRX2-κύτταρα επιμολύνθηκαν με πλασμίδιο που κωδικοποιεί μία μονίμως ενεργή p44 MAPK (pLA), με πλασμίδιο που κωδικοποιεί μία ανενεργή p44 MAPK (pKR) ή με πλασμίδιο μάρτυρα (pContI). Μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα επώαστηκαν με 0,5 mM GSNO για 2 h. Οι HIF-1α και ακτίνη ανιχνεύτηκαν με ανοσοσύτωση κατά Western. Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

### 3.1.3 Οι TRX1 και TRX2/TRXR2 επηρεάζουν διαφορετικά τα επίπεδα του ATP

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι TRX2 και TRXR2 εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια, όπου παράγεται το ATP, καθώς και ότι το μόριο αυτό απαιτείται, ανάμεσα σε άλλες διαδικασίες και για την πρωτεϊνοσύνθεση, αναρωτηθήκαμε εάν η TRX2 ή/ και η TRXR2 επηρεάζουν τα επίπεδά του. Μετρώντας το ενδοκυττάριο ποσό του ATP, παρατηρήσαμε αυξημένα επίπεδα στα TRX1-κύτταρα, αλλά μειωμένα στα TRX2 και TRXR2 σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες (**Εικόνα 35A**). Κατά τη διάρκεια αυτών των μετρήσεων δεν παρατηρήσαμε διαφορά στα επίπεδα ATP ανάμεσα στα κύτταρα που επώαστηκαν με GSNO και στα αντίστοιχα κύτταρα μάρτυρες. Η ολιγομυκίνη αναστέλλει την ATP-συνθετάση και, συνεπώς, μειώνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Πράγματι, η χορήγηση 0,5 μM ολιγομυκίνης μείωσε σημαντικά το περιεχόμενο ATP σε όλα τα κύτταρα (**Εικόνα 35B**), καθώς και την GSNO-επαγόμενη συσσώρευση της HIF-1α στα TRX1-κύτταρα (**Εικόνα 35Γ**). Μία εναλλακτική προσέγγιση για τη μείωση του ATP είναι η χρήση θρεπτικού μέσου χωρίς γλυκόζη σε συνδυασμό με 2-δεοξυγλυκόζη. Χρησιμοποιώντας αυτό το πειραματικό σύστημα, δείξαμε ότι η συσσώρευση της HIF-1α ελαττώνεται σημαντικά σε όλα τα κύτταρα (**Εικόνα 35Δ**). Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν τη θεωρία ότι το ενδοκυττάριο ATP συνεισφέρει στην ενισχυμένη ή ελαττωμένη μετάφραση της HIF-1α και, κατά αυτόν τον τρόπο, μπορεί να επηρεάζει την έκφραση της HIF-1α ως απόκριση στο GSNO.





**Εικόνα 35.** Οι TRX1 και TRX2/TRXR2 επηρεάζουν διαφορετικά τα κυτταρικά επίπεδα ATP.

(**A και B**) HEK1, TRX1-, TRX2- και TRXR2-κύτταρα επωάστηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες, με 0,5 mM GSNO για 2 h, με 0,5 mM GSNO και 0,5 μM ολιγομυκίνη για 2 h (GSNO+ΟλιγοM) ή με 0,5 μM ολιγομυκίνη για 2 h (ΟλιγοM). Το περιεχόμενο του κυττάρου σε ATP μετρήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μεθόδους» και κανονικοποιήθηκε ως προς τα HEK1 κύτταρα-μάρτυρες. Οι τιμές που δίνονται είναι οι μ.ό. ± τυπική απόκλιση από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα. (**Γ**) TRX1-κύτταρα επωάστηκαν υπό φυσιολογικές συνθήκες, με 0,5 μM ολιγομυκίνη για 2 h (ΟλιγοM), με 0,5 mM GSNO για 2 h ή με 0,5 mM GSNO και 0,5 μM ολιγομυκίνη για 2 h (GSNO+ΟλιγοM). (**Δ**) HEK1 κύτταρα-μάρτυρες, TRX1-, TRX2- και TRXR2- HEK1 κύτταρα επωάστηκαν 0,5 mM GSNO παρουσία ή απουσία 5 mM 2-δεοξυγλυκόζης (2-DG) σε πλήρες θρεπτικό ή σε θρεπτικό χωρίς γλυκόζη, όπως υποδεικνύεται. Οι HIF-1α και ακτίνη ανιχνεύτηκαν με ανοσοσύτρωση κατά Western. Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. \* $p < 0,05$ .

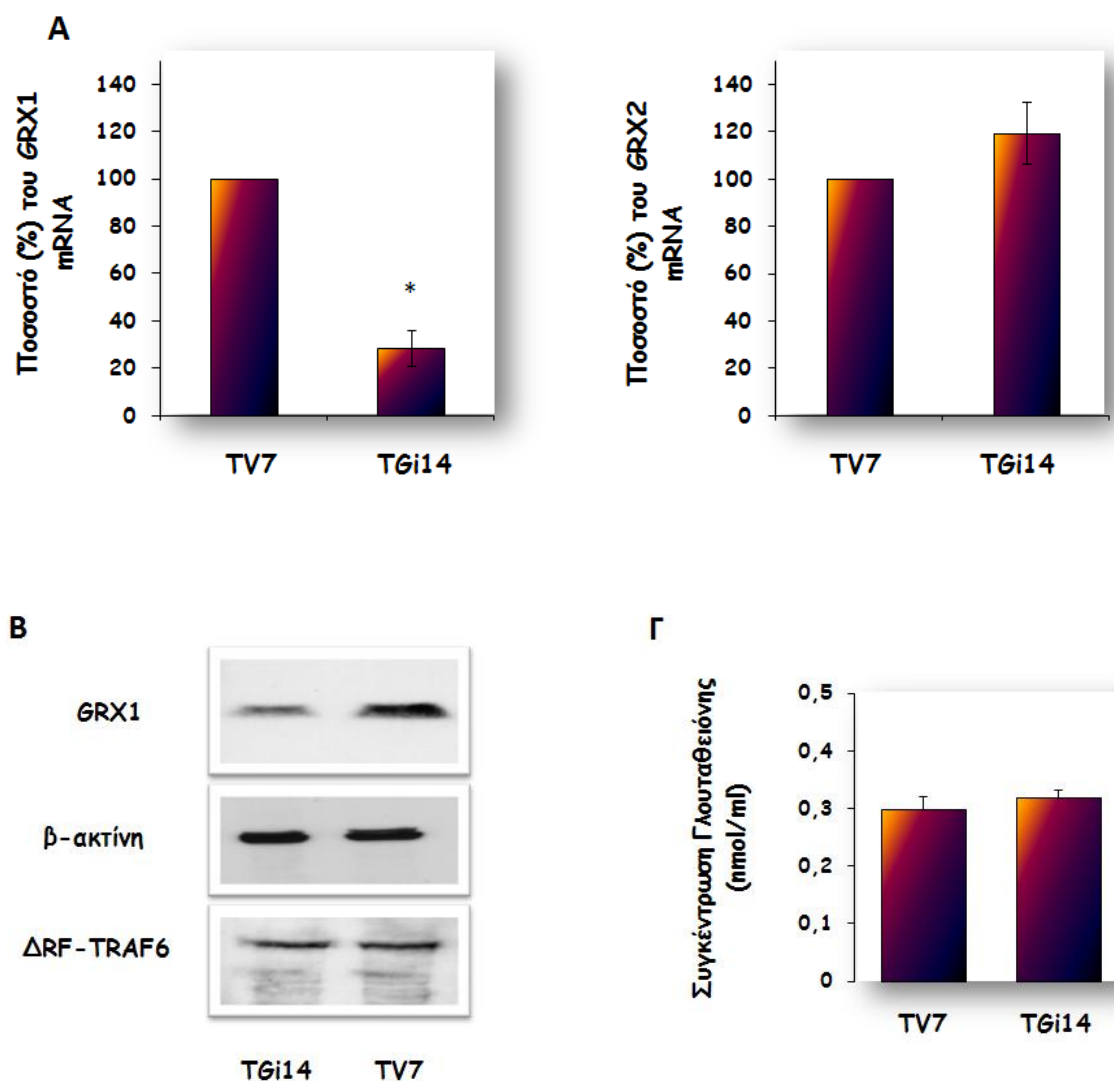
### 3.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ GRX1 ΣΕ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΟΣΙΑΣ

Όπως έχει ήδη αναλυθεί, η GRX1 διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στο αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας. Στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε το ρόλο της σε δύο μονοπάτια ενδογενούς ανοσίας: σε αυτό που κινητοποιείται από τον IL-1R ή τον TLR4 και σε εκείνο που οδηγεί στην παραγωγή IFNβ μετά την προσβολή με Sendai virus.

#### 3.2.1 Κυτταρικές σειρές με μειωμένα επίπεδα GRX1

Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της GRX1 σε διαφορετικά μονοπάτια της ενδογενούς ανοσίας, δημιουργήσαμε μία κυτταρική σειρά HEK293 που σταθερά υποεκφράζει την GRX1 μέσω παρεμβόλιμου RNA (RNAi, RNA interference), τα TGi14, καθώς και την αντίστοιχη κυτταροσειρά ελέγχου, τα TV7, που είναι επιμολυσμένα με τον άδαιο φορέα κλωνοποίησης. Τα επίπεδα του mRNA της GRX1 στα TGi14 και TV7 κύτταρα υπολογίστηκαν με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR, RT-PCR). Τα TGi14 κύτταρα παρουσίαζαν 71% μείωση στο mRNA της GRX-1 σε σύγκριση με την κυτταροσειρά ελέγχου (**Εικόνα 36A**). Η ειδικότητα του RNAi για την GRX1 επιβεβαιώθηκε με RT-PCR για την GRX-2, μία άλλη γλουταρεδοξίνη που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 36A**). Τα ενδογενή πρωτεϊνικά επίπεδα της GRX-1 ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης του αντι-GRX1 αντισώματος που χρησιμοποιήσαμε, έτσι εξετάσαμε τα πρωτεϊνικά

επίπεδα της GRX1 σε TV7 και TGi14 κύτταρα επιμολυσμένα με τα pIRES-GRX1 και ΔRF-TRAF6 πλασμίδια έκφρασης (το τελευταίο χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ελέγχου της αποτελεσματικότητας της επιμόλυνσης). Η GRX1 ήταν μειωμένη στα TGi14 κύτταρα σε σύγκριση με τα TV7 (**Εικόνα 36B**). Η μείωση των επιπέδων της GRX1 δεν επηρέασε τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης TGi14 κύτταρα (**Εικόνα 36Γ**).



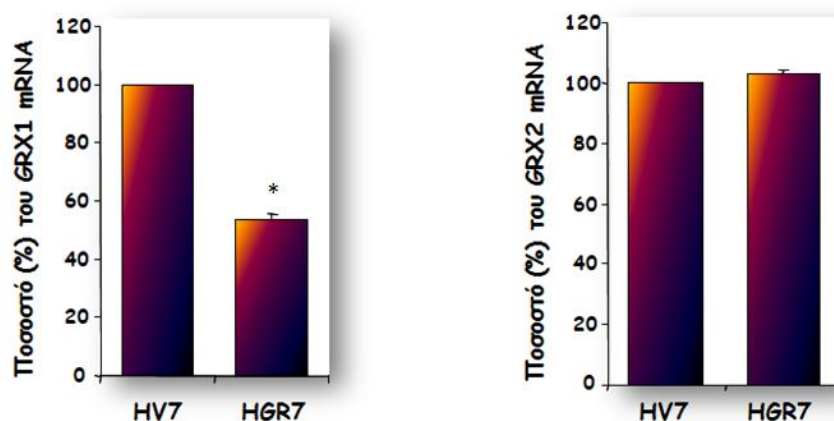
**Εικόνα 36. Μείωση της έκφρασης της GRX1 μέσω RNAi.**

(**A**) Πραγματοποιήθηκε ανάλυση μέσω RT-PCR σε cDNA από TV7 και TGi14 κύτταρα για να υπολογιστούν τα επίπεδα του mRNA της GRX1 (διάγραμμα αριστερά) και της GRX2 (διάγραμμα δεξιά). Οι τιμές έχουν διορθωθεί από τις αντίστοιχες τιμές του mRNA της GAPDH για κάθε δείγμα. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. (**B**) TV7 και TGi14 κύτταρα επιμολύνθηκαν με 0,5 μg pIRES-GRX1 μαζί με 0,5 μg cDNA3 FLAG-ΔRF-TRAF6 για να ελεγχθεί η απόδοση της επιμόλυνσης. Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοοστυπώθηκαν με αντισώματα για την GRX1, το FLAG επίτοπο και τη β-ακτίνη ως δείκτη των ποσοτήτων που φορτώθηκαν. (**Γ**) Η συγκέντρωση της



γλουταθειόνης υπολογίστηκε σε TV7 και TG14 κύτταρα. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές από τρία ανεξάρτητα πειράματα εκφρασμένες σε nmol/ml κυτταρικών εκχυλισμάτων. \* $p < 0,05$ .

Με τον ίδιο τρόπο, δημιουργήσαμε μία HeLa κυτταρική σειρά που υποεκφράζει την GRX1 μέσω RNAi, την HGR7 και μία κυτταρική σειρά ελέγχου, την HV7, επιμολυσμένη με τον άδειο φορέα (Εικόνα 37).



**Εικόνα 37. Μείωση των επιπέδων της GRX1 μέσω RNAi.**

Τα cDNAs από HV7 και HGR7 HeLa κύτταρα αναλύθηκαν μέσω Real-time PCR προκειμένου να υπολογιστούν τα επίπεδα mRNA των GRX1 (διάγραμμα αριστερά) και GRX2 (διάγραμμα δεξιά). Οι τιμές έχουν διορθωθεί από τις αντίστοιχες τιμές του mRNA της GAPDH για κάθε δείγμα. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. \* $p < 0,05$ .

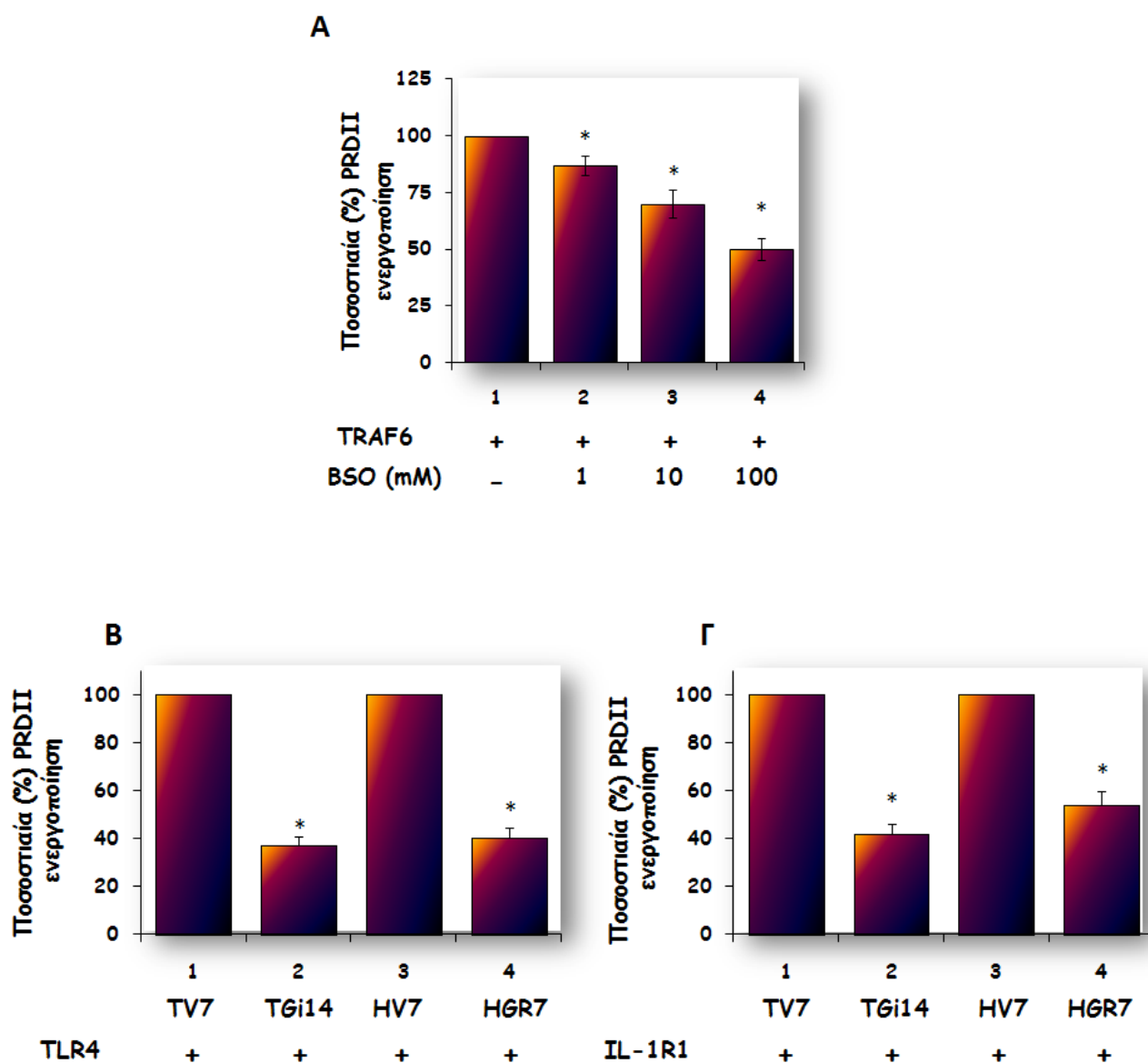
### 3.2.2 Η GRX1 ρυθμίζει την ενεργοποίηση του TRAF6 και την IL-1/TLR4 σηματοδότηση

Ο TRAF6 είναι ένα κρίσιμο σηματοδοτικό μόριο για τα μέλη των οικογενειών των ιντερλευκίνη-1/Toll-like υποδοχών (IL-1R1/TLR) και του υποδοχέα του TNF (TNFR). Ο TRAF6 δρα ως λιγάση ουβικιτίνης και ως μόριο-προσαρμοστής στη διαμόρφωση σηματοδοτικών συγκροτημάτων μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Ελέγξαμε πώς συμμετέχει η GRX1 στο παραπάνω μονοπάτι και συγκεκριμένα στην ενεργοποίηση του TRAF6.

#### 3.2.2.1 Η GRX1 είναι αναγκαία για την προερχόμενη από τον TRAF6 ενεργοποίηση του NF-κB

Ο TRAF6 ενεργοποιεί το μονοπάτι του NF-κB όταν υπερεκφράζεται στα κύτταρα (Baud V et al., 1999). HEK 293 κύτταρα επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς PRDII-luciferase (PRDII-luc) μαζί με pCDNA-TRAF6 ως ενεργοποιητή του NF-κB. Στα κύτταρα χορηγήθηκαν ή όχι αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSO για 4 ημέρες. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 38A**, το BSO ανέστειλε την TRAF6-επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-κB κατά έναν δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το BSO είναι μια ουσία που εμποδίζει το σχηματισμό της γλουταθειόνης μέσα στα κύτταρα, ως εκ τούτου θεωρήσαμε ότι η γλουταθειόνη ήταν απαραίτητη για την ενεργοποίηση του NF-κB μονοπατιού από τον TRAF6.





**Εικόνα 38. Η TRAF6-επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-κΒ εξαρτάται από τις GSH και GRX1.**

(A) Η ενεργοποίηση του NF-κΒ από τον TRAF6 αναστέλλεται με τη χορήγηση BSO: Μέση ποσοστιαία (%) ενεργοποίηση του NF-κΒ σε HEK293 κύτταρα επιμολυσμένα με το rCDNA-TRAF6 (0,5 μg/~300.000 κύτταρα) στα οποία έχουν χορηγηθεί ή όχι αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSO. Ο NF-κΒ ενεργοποιείται λιγότερο στα κύτταρα που υποεκφράζουν την GRX1: Ποσοστιαία (%) ενεργοποίηση του NF-κΒ σε HEK 293 και HeLa κυτταρικές σειρές επιμολυσμένες είτε με το (B) rCDNA3 – TLR4 (0,5 μg/~300.000 κύτταρα) ή με το (Γ) rCDNA3 – IL-1R1 (0,5 μg/~300.000 κύτταρα). Σε όλα τα πειράματα οι τιμές λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές β-γαλακτοσιδάσης (0,1 μg rGK-β-gal πλασμιδίου αναφοράς ανά ~300.000 κύτταρα). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος±s.d. από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα. \*p<0,05.

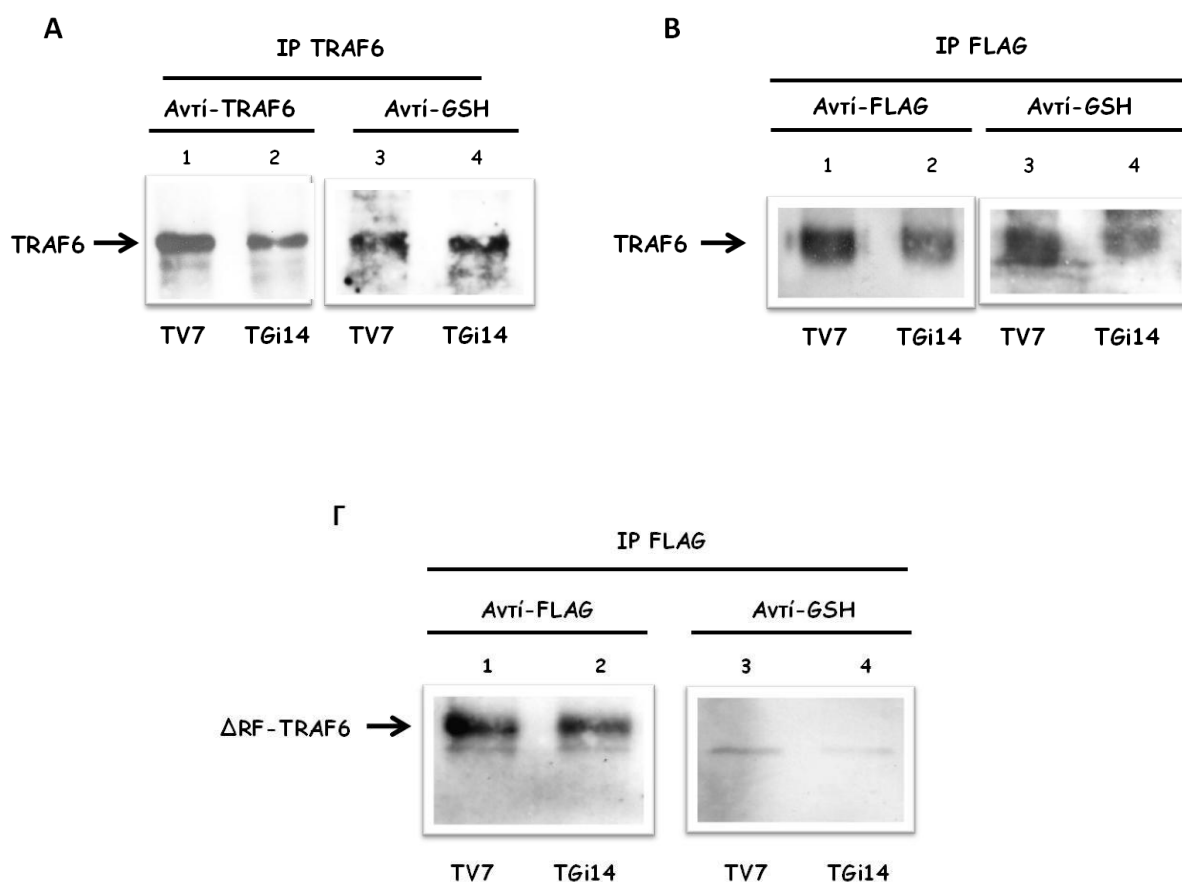
Είναι γνωστό ότι η γλουταθειόνη είναι απαραίτητη για να αναγεννηθεί η δραστική (ανηγμένη) μορφή της GRX1, άρα χρειάζεται για την ενεργότητα του ενζύμου (Yang Y et al., 1998). Επομένως, ίσως αυτός να είναι ο ρόλος της GSH στην TRAF6-επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-κΒ, να συμμετέχει στην αναγέννηση την GRX1. Προκειμένου να διερευνήσουμε αυτή την υπόθεση, χρησιμοποιήσαμε τις σταθερά επιμολυσμένες κυτταρικές σειρές HEK 293 και HeLa που περιγράψαμε και ελέγξαμε εάν η έλλειψη της GRX1 επηρεάζει το παραπάνω μονοπάτι με τα πειράματα επιμόλυνσης που περιγράφονται στις **Εικόνες 38B και Γ**. Η υπερεκφραση του TLR4 και του IL-1R1 μιμείται τη σηματοδότηση του LPS και της IL-1 αντίστοιχα και ενεργοποιεί το NF-κΒ μονοπάτι (Brint EK et al., 2002; Medzhitov R et al., 1997). Τόσο το LPS όσο και η IL-1 ενεργοποιούν τον NF-κΒ μέσω του TRAF6 (Lomaga MA et al., 1999; Naito A et al., 1999). Τα κύτταρα που υποεκφράζουν την GRX1 παρουσιάζουν 45-63% λιγότερη NF-κΒ ενεργοποίηση. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι η TRAF6-διαμεσολαβούμενη ενεργοποίηση του NF-κΒ βασίζεται στη δράση της GRX1.

### 3.2.2.2 Ο TRAF6 γλουταθειονυλιώνεται στην περιοχή του RING δαχτύλου

Από τη στιγμή που η GRX1 εμπλέκεται στη διαδικασία S-γλουταθειονυλίωσης/απογλουταθειονυλίωσης διάφορων πρωτεϊνών (Gallogly MM and Mieyal JJ, 2007), διερευνήσαμε αν ο TRAF6 είναι S-γλουταθειονυλιωμένος. Ανοσοκατακρημνίσαμε TRAF6 από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα TV7 και TG14 κυττάρων και ανοσοοτυπώσαμε κατά Western με αντι-TRAF6 και αντι-GSH αντισώματα. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 39A**, ο TRAF6 είναι S-γλουταθειονυλιωμένος υπό κανονικές συνθήκες. Ο υπερεκφρασμένος, σημασμένος με FLAG TRAF6, που ανοσοκατακρημνίστηκε με αντι-FLAG αντίσωμα βρέθηκε, επίσης, S-γλουταθειονυλιωμένος (**Εικόνα 39B**). Αντιθέτως, ο ανοσοκατακρημνισμένος, FLAG-σημασμένος ΔRF-TRAF6 δεν ήταν S-γλουταθειονυλιωμένος, οπότε η S-γλουταθειονυλίωση του TRAF6 λαμβάνει χώρα στο μοτίβο RING finger του μορίου.

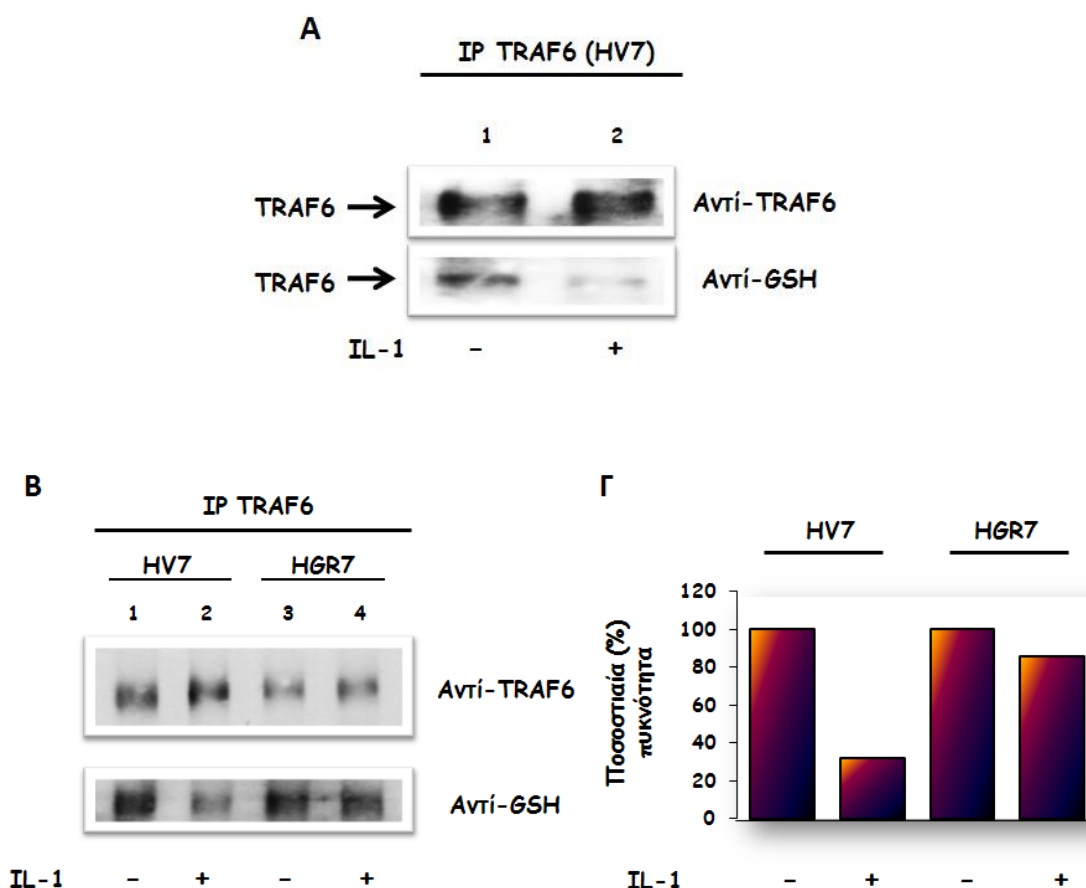
### 3.2.2.3 Ο TRAF6 απογλουταθειονυλιώνεται μετά την επαγωγή με IL-1

Από τη στιγμή που η GRX1 είναι υπεύθυνη για την απογλουταθειονυλίωση αρκετών S-γλουταθειονυλιωμένων πρωτεϊνών, εξετάσαμε εάν ο TRAF6 υπόκειται σε απογλουταθειονυλίωση κατά την επαγωγή. Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα από HV7 κύτταρα ενεργοποιημένα ή μη με IL-1 (15 ng/~300.000 κύτταρα, 25 min) χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση του TRAF6. Ανάλυση κατά Western έδειξε ότι ο TRAF6 απογλουταθειονυλιώνεται κατά την επαγωγή με IL-1 (**Εικόνα 40A**). Η συνολική απογλουταθειονυλίωση του TRAF6 είναι πολύ λιγότερη στα HGR7 κύτταρα, στα οποία η GRX1 υποεκφράζεται (**Εικόνες 40B Γ, σύγκρινε στήλες 2 και 4**). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η απογλουταθειονυλίωση του TRAF6 που παρατηρείται κατά την επαγωγή ελέγχεται από την GRX1.



**Εικόνα 39.** Ο TRAF6 είναι S-γλουταθειονυλιωμένος υπό φυσιολογικές συνθήκες στην περιοχή του RING finger.

**(Α)** Ανοσοκατακρήμιση TRAF6 από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα TV7 και TGi14 κυττάρων. Με αντί-TRAF6 και αντί-GSH αντισώματα. Ο TRAF6 είναι S-γλουταθειονυλιωμένος υπό φυσιολογικές συνθήκες. **(Β)** Ανοσοκατακρήμιση του FLAG-TRAF6 από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα TV7 και TGi14 κυττάρων επιμολυσμένων με pCDNA3-FLAG-TRAF6. Ανοσοσύτωση κατά Western με αντι-FLAG και αντί-GSH αντισώματα αποκαλύπτουν ότι ο υπερεκφρασμένος FLAG-σημασμένος TRAF6 είναι S-γλουταθειονυλιωμένος υπό φυσιολογικές συνθήκες. **(Γ)** Ανοσοκατακρήμιση του FLAG-ΔRF TRAF6 από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα TV7 και TGi14 κυττάρων επιμολυσμένων με pCDNA3-FLAG-ΔRF TRAF6. Ανάλυση με ανοσοσύτωση κατά Western με αντί-FLAG και αντί-GSH αντισώματα αποκάλυψαν ότι ο ΔRF-TRAF6 δεν είναι S-γλουταθειονυλιωμένος.



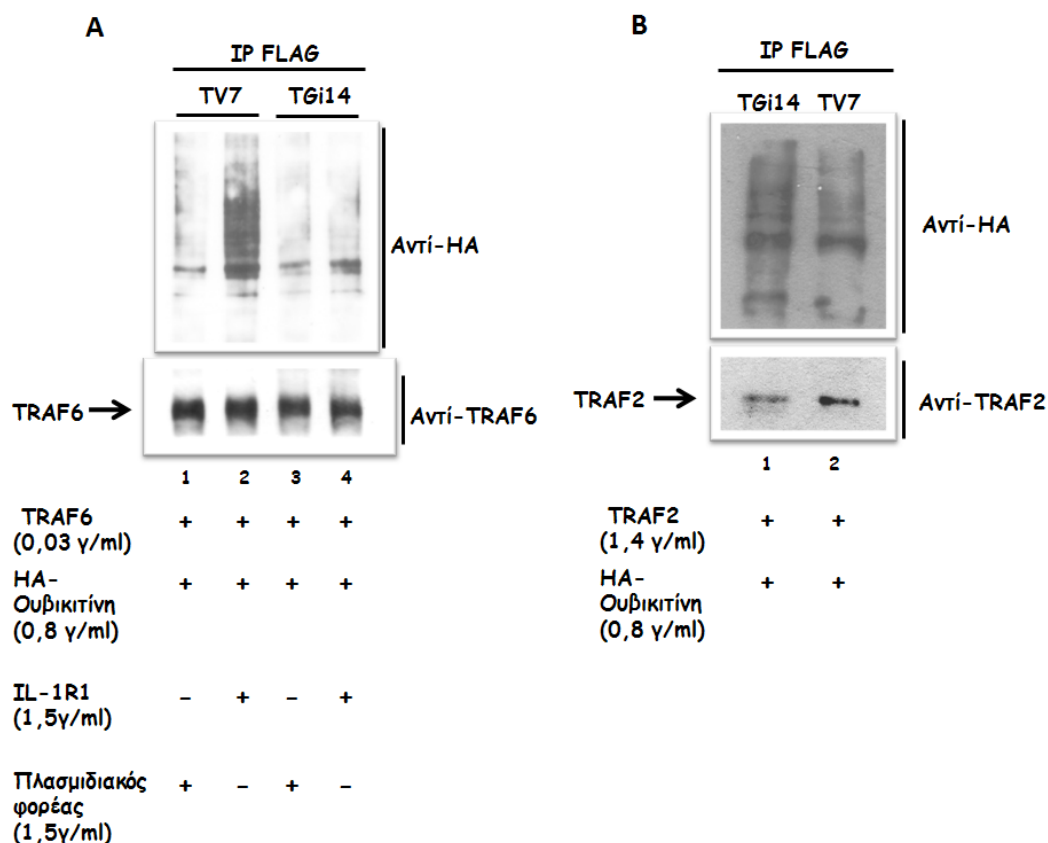
**Εικόνα 40.** Ο TRAF6 απογλουταθειουλιώνεται κατά την επαγωγή με IL-1 και το βήμα αυτό ελέγχεται από την GRX1.

(Α) Ανοσοκατακρήμνιση του TRAF6 από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα HV7 κυττάρων ενεργοποιημένων ή μη με IL-1 (15 ng/ml) για 25 min. Ο TRAF6 απογλουταθειουλιώνεται μετά την επαγωγή με IL-1. (Β) Ανοσοκατακρήμνιση του TRAF6 από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα HV7 και HGR7 κυττάρων ενεργοποιημένων ή μη με IL-1 (15 ng/ml) για 25 min. Οι πρωτεΐνες ανοσοκατακρημνήθηκαν με το αντί-TRAF6 αντίσωμα και ανοσοστυπώθηκαν κατά Western με τα αντί-TRAF6 και αντί-GSH αντισώματα. Η συνολική απογλουταθειουλίωση του TRAF6 είναι μεγαλύτερη στα HV7 κύτταρα από ό,τι στα HGR7 που υποεκφράζουν την GRX1. (Γ) Ποσοστιαία (%) πυκνότητα των ζωνών της ανοσοστύπωσης κατά Western. Οι πυκνότητες των GSH ζωνών έχουν κανονικοποιηθεί με βάση τις πυκνότητες των αντίστοιχων TRAF6 ζωνών. Η απογλουταθειουλίωση του TRAF6 κατά την επαγωγή με IL-1 είναι 5 φορές λιγότερη στα HGR7 από ό,τι στα κύτταρα ελέγχου.

#### 3.2.2.4 Η απογλουταθειουλίωση του TRAF6 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή του

Ο TRAF6 έχει ενεργότητα λιγάσης ουβικιτίνης και η ενεργοποίησή του βασίζεται στην αυτό-πολυουβικιτίνωσή του (Deng L et al., 2000; Lamothe B et al., 2007). Για να διερευνήσουμε εάν η GRX1 επηρεάζει την ενεργοποίηση του TRAF6, επιμολύναμε TV7 και TG14 κύτταρα με FLAG-σημασμένο TRAF6 μαζί με pCDNA3-HA-Ub και τον άδειο φορέα κλωνοποίησης ή τον pCDNA3-IL-1R1 ως ενεργοποιητή. Τα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα από τα επιμολυσμένα κύτταρα

χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμιση του FLAG-TRAF6 και εν συνεχεία ανοσοστυπώθηκαν κατά Western με τα αντι-FLAG και αντι-HA αντισώματα.



**Εικόνα 41.** Η πολυουβικιτίνωση του TRAF6 κατά την επαγωγή μειώνεται αισθητά στα κύτταρα που υποεκφράζεται η GRX1 και η ελάττωση αυτή είναι ειδική για την πρωτεΐνη του TRAF6.

**(A)** Η ενεργοποίηση – πολυουβικιτίνωση του TRAF6 μειώνεται στα TV7. Ανοσοκατακρήμιση του FLAG-TRAF6 από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα TV7 και TGi14 κυττάρων επιμολυσμένων με τα pCDNA3-FLAG-TRAF6 και pCDNA3-HA-ubiquitin. Τα κύτταρα συνεπιμολύνθηκαν είτε με το pCDNA3-IL-1R1 ή με τον άδειο φορέα pCDNA3. Οι πρωτεΐνες ανοσοστυπώθηκαν κατά Western με τα αντί-TRAF6 και αντί-HA αντισώματα. Η ουβικιτίνωση του TRAF6 μειώνεται αισθητά στα κύτταρα με ελαττωμένα επίπεδα GRX1 KD που ενεργοποιήθηκαν με τον IL-1R1. **(B)** Ο pCDNA3-FLAG-TRAF2 υπερεκφράστηκε σε TV7 και TGi14 μαζί με το pCDNA3-HA-ουβικιτίνη και ανοσοκατακρημνίστηκαν με το αντί-FLAG αντίσωμα. Η ενεργοποίηση – πολυουβικιτίνωση του TRAF2 δε μειώθηκε στα TGi14 κύτταρα.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 41A**, η ουβικιτίνωση του TRAF6 μειώνεται στα κύτταρα όπου η GRX1 υποεκφράζεται. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ξεκάθαρα ότι η απογλουταθειονυλίωση του TRAF6 απαιτείται για την αποτελεσματική ουβικιτίνωση και τη μετέπειτα ενεργοποίηση του μορίου. Η GRX1 ελέγχοντας την απογλουταθειονυλίωση του TRAF6 ελέγχει και την ενεργοποίησή

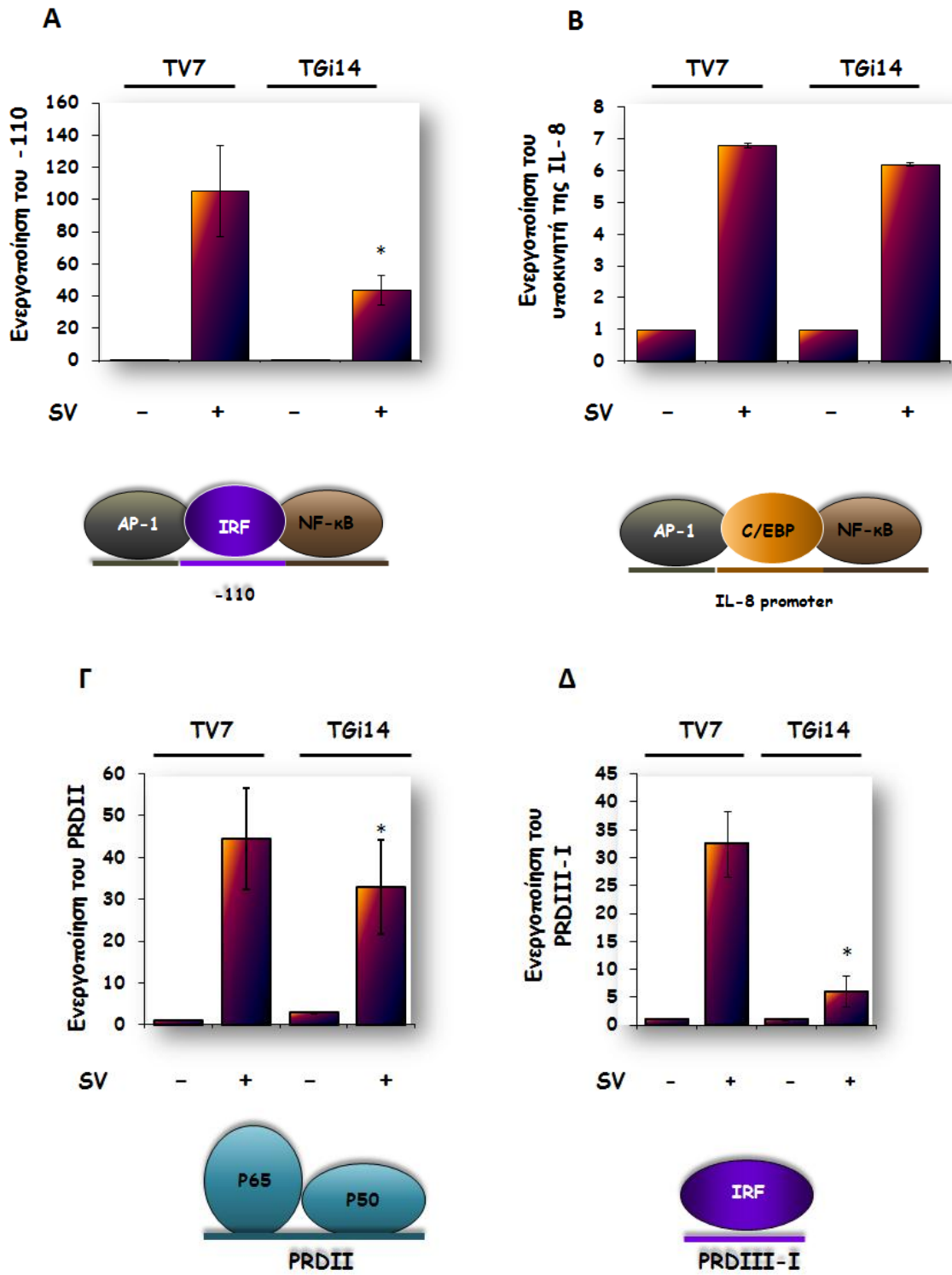
του. Η ειδικότητα του φαινομένου αυτού υπογραμμίζεται από την παρατήρηση που αποτυπώνεται στην **Εικόνα 41B**. Ο υπερεκφρασμένος TRAF2 ουβικιτινώνεται και στις δύο κυτταρικές σειρές, αλλά η μείωση της GRX1 φαίνεται να προωθεί αυτή την ουβικιτίνωση.

### **3.2.3 Η GRX1 συμμετέχει στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της IFNβ**

Ο IRF3 είναι απαραίτητος μεταγραφικός παράγοντας για τα γονίδια της IFN. Ο IRF3 είναι συνεχώς παρών σε λανθάνουσα κατάσταση στο κυτταρόπλασμα. Σε κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό Sendai (SV), ο IRF3 φωσφορυλιώνεται, σχηματίζει ομοδιμερή, μεταβαίνει στον πυρήνα, συνδέεται με τα γονίδια-στόχο και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου της IFNβ αλληλεπιδρώντας με τους συν-ενεργοποιητές CBP/p300. Σε αυτή τη μελέτη, διερευνήσαμε εάν το παραπάνω μονοπάτι επηρεάζεται από την GRX1.

#### **3.2.3.1 Η GRX1 είναι απαραίτητη για την ική ενεργοποίηση της -110 γενετικής περιοχής**

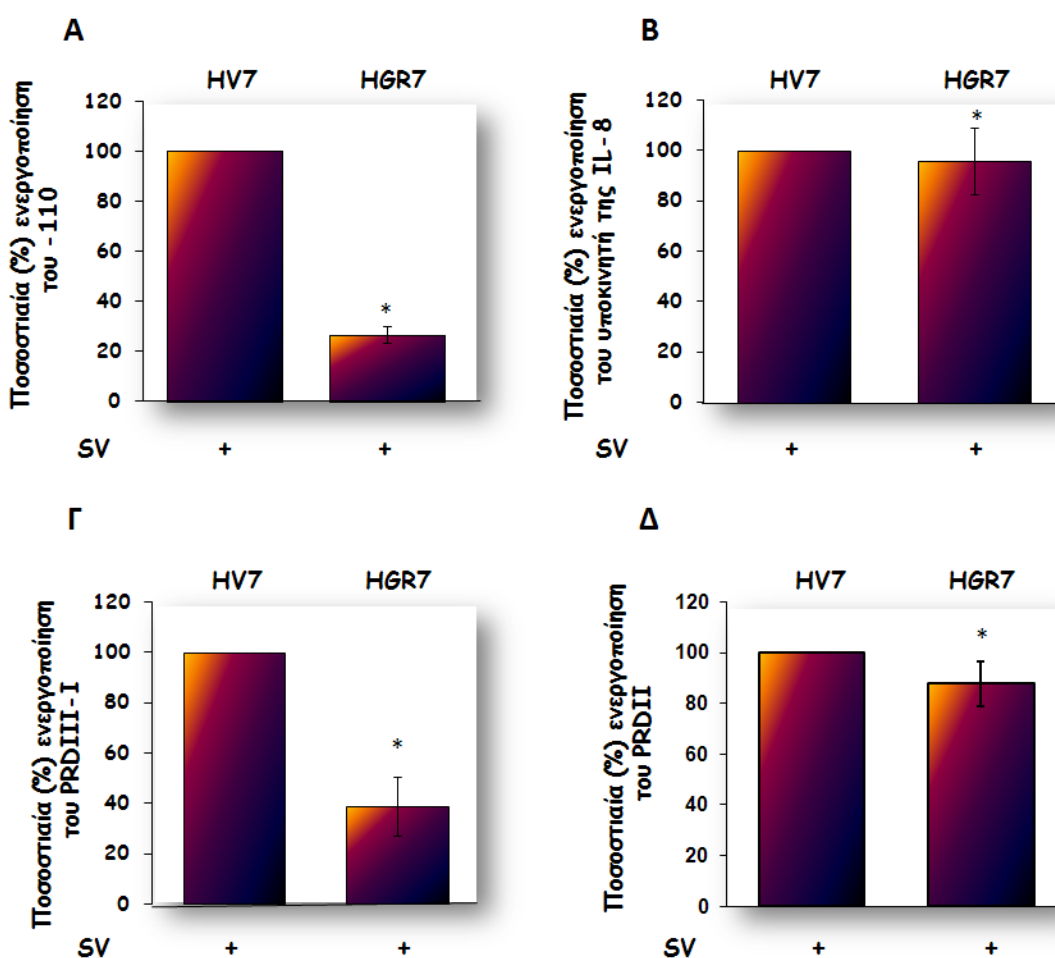
Για να διερευνήσουμε κατά πόσο η GRX1 συμμετέχει στο μονοπάτι ενεργοποίησης του γονιδίου της IFNβ, TV7 και TG14 κύτταρα επιμολύνθηκαν με πλασμίδια αναφοράς είτε με τον -110-luc (υποκινητής της IFNβ) ή με τον IL-8-υποκινητή-luc και 18 ώρες αργότερα μολύνθηκαν ή όχι με τον ιό Sendai για 9 ώρες. Η υποέκφραση της GRX1 οδήγησε σε περίπου 60% χαμηλότερη ενεργοποίηση του συνόλου του υποκινητή της IFNβ κατά την ική προσβολή (**Εικόνα 42A**), ενώ δεν υπήρχε σχεδόν καμία διαφορά στην ενεργοποίηση του υποκινητή της IL-8 (**Εικόνα 42B**). Τόσο ο υποκινητής της IL-8 όσο και ο και -110 περιέχουν NF-κB και AP-1-θέσεις δέσμευσης, αλλά ο πρώτος έχει θέση πρόσδεσης C/EBP αντί των IRF-θέσεων πρόσδεσης. Έτσι, το επόμενο βήμα μας ήταν να εξετάσουμε εάν η μείωση των επιπέδων της GRX1 επηρεάζει την ενεργοποίηση του NF-κB χρησιμοποιώντας το PRDII<sub>4</sub>-luc (τέσσερις NF-κB-θέσεις πρόσδεσης) πλασμίδιο αναφοράς. Χρησιμοποιήσαμε επίσης το PRDIII-I<sub>3</sub>-luc (12 IRF-θέσεις πρόσδεσης) πλασμίδιο αναφοράς. Όπως βλέπουμε στις **Εικόνες 42Γ, Δ**, η NF-κB ενεργοποίηση στα μολυσμένα με ιό TG14 κύτταρα επηρεάστηκε ελαφρά, ενώ σε αυτά τα κύτταρα η IRF-εξαρτώμενη ενεργοποίηση μετά την ική μόλυνση μειώθηκε αισθητά. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι GRX-1 απαιτείται για IRF-εξαρτώμενη μεταγραφή μετά την ική μόλυνση.



Εικόνα 42. Ενεργοποίηση των πλασμιδίων αναφοράς -110, IL-8, PRDII και PRDIII-I στις TV7 και TGi14 κυτταρικές σειρές.

Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια (0,3 μg ανά ~300.000 κύτταρα) και 18 h μετά επιμολύνθηκαν με τον ιό Sendai (SV) για 9 h. **(Α)** ενεργοποίηση του -110-luc, **(Β)** ενεργοποίηση του IL-8-luc, **(Γ)** ενεργοποίηση του PRDIII<sub>4</sub>-luc, **(Δ)** ενεργοποίηση του PRDIII-I<sub>3</sub>-luc. Σε όλα τα πειράματα οι τιμές λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές β-γαλακτοσιδάσης (0,1 μg pGK-β-gal πλασμιδίου αναφοράς ανά ~300.000 κύτταρα). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος±s.d. από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα. \*p<0,05.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω βρίσκονται και τα αποτελέσματα από τα αντίστοιχα πειράματα επιμόλυνσης στις HGR7 και HV7 κυτταροσειρές **(Εικόνα 43)**.



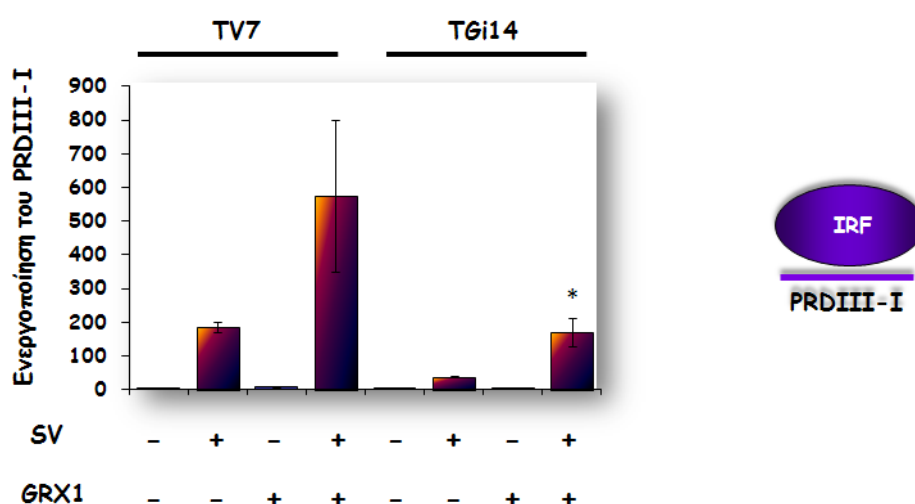
**Εικόνα 43.** Ενεργοποίηση των πλασμιδίων αναφοράς -110, IL-8, PRDIII-I και PRDII στις HV7 και HGR7 κυτταρικές σειρές.

Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια (0,3 μg ανά ~300.000 κύτταρα) και 18 h μετά μολύνθηκαν με τον ιό Sendai (SV) για 9 h. **(Α)** ενεργοποίηση του -110-luc, **(Β)** ενεργοποίηση του IL-8-luc, **(Γ)** ενεργοποίηση του PRDIII-I<sub>3</sub>-luc, **(Δ)** ενεργοποίηση του PRDII<sub>4</sub>-luc. Σε όλα τα πειράματα οι τιμές λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές β-γαλακτοσιδάσης (0,1 μg pGK-β-gal πλασμιδίου αναφοράς ανά ~300.000 κύτταρα). Τα



αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ s.d. από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα. \* $p < 0,05$ .

**3.2.3.2 Αποκατάσταση της ικής επαγωγής στα TGi14 μέσω υπερέκφρασης της GRX1** Για να ελέγξουμε την ειδικότητα της παραπάνω παρατήρησης, TV7 και TGi14 κύτταρα επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς PRDIII-I<sub>3</sub>-luc μαζί με τον άδειο φορέα ή με το pIRES-GRX1 και μολύνθηκαν με τον ιό Sendai, όπως περιγράφεται παραπάνω. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 44**, τα επιμολυσμένα με την GRX1 κύτταρα ελέγχου όταν ενεργοποιηθούν με τον ιό Sendai επάγουν τη μεταγραφή πιο αποτελεσματικά σε σύγκριση με τα επιμολυσμένα με τον άδειο φορέα κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν από τον ίδιο ιό, υποδεικνύοντας συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις (**σύγκρινε τις στήλες 2, 3 και 4**). Η επιμόλυνση των TGi14 με GRX1 οδήγησε στην αποκατάσταση της IRF-ενεργοποίησης μετά την ική επαγωγή, φθάνοντας σε επίπεδα παρόμοια με αυτά των κυττάρων ελέγχου που επιμολύνθηκαν με τον άδειο φορέα και μολύνθηκαν με τον ιό (**σύγκρινε τις στήλες 2 και 8**).



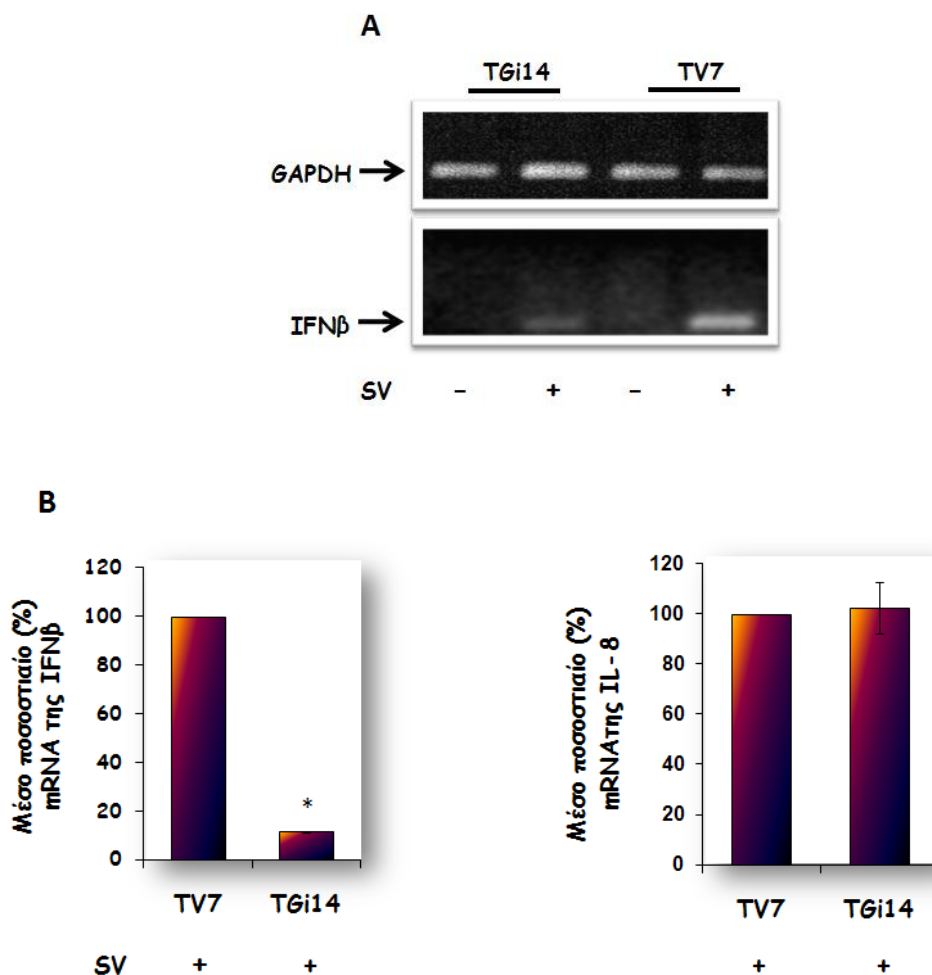
**Εικόνα 44.** Ενεργοποίηση του PRDIII-I πλασμιδίου αναφοράς σε TV7 και TGi14 κύτταρα επιμολυσμένα ή μη με την GRX1 και ενεργοποιημένα ή μη από το Sendai virus.

Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με PRDIII-I<sub>3</sub>-luc (0,3  $\mu$ g ανά  $\sim$ 300.000 κύτταρα) και GRX-1 (0,4  $\mu$ g/ $\sim$ 300.000 κύτταρα) και 18 h μετά μολύνθηκαν με το Sendai virus για 9 h. Σε όλα τα πειράματα οι τιμές λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές  $\beta$ -γαλακτοσιδάσης (0,1  $\mu$ g pGK- $\beta$ -gal πλασμιδίου αναφοράς ανά  $\sim$ 300.000 κύτταρα). \* $p < 0,05$ .

### 3.2.3.3 Τα επίπεδα της GRX1 επηρεάζουν την παραγωγή της IFN $\beta$ μετά την επαγωγή με ιό

Για να εκτιμηθεί η φυσιολογική συμμετοχή της GRX1 στην αντί-ϊκή απόκριση, TV7 και TGi14 κύτταρα μολύνθηκαν με τον ιό Sendai και 9 ώρες μετά, απομονώθηκε συνολικό RNA και χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή cDNA μέσω της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, rt). Το cDNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο σε ημι-ποσοτική PCR προσδιορισμού IFN $\beta$  και GAPDH (για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων) (**Εικόνα 45A**). Επίσης, πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου για την IFN $\beta$  και την IL-8 (**Εικόνα**

**45B).** Και οι δύο αναλύσεις έδειξαν ότι στα TGi14 κύτταρα η μεταγραφή του γονιδίου της IFN $\beta$  μετά την ιική επαγωγή ήταν μειωμένη, ενώ η παραγωγή της IL-8 δεν επηρεάστηκε, υποδεικνύοντας έναν βασικό ρόλο για την GRX1 στην πρωτογενή αντι-ιική απόκριση των κυττάρων.



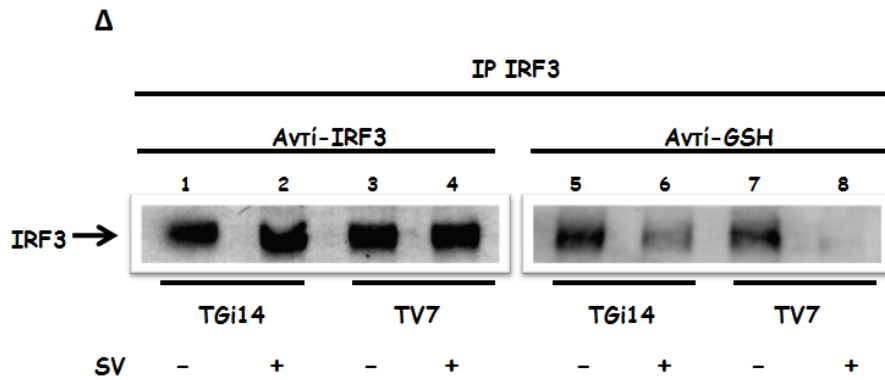
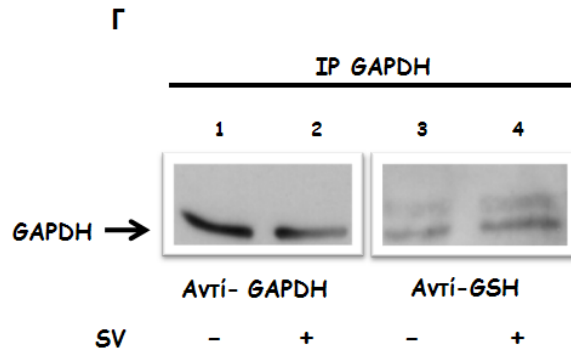
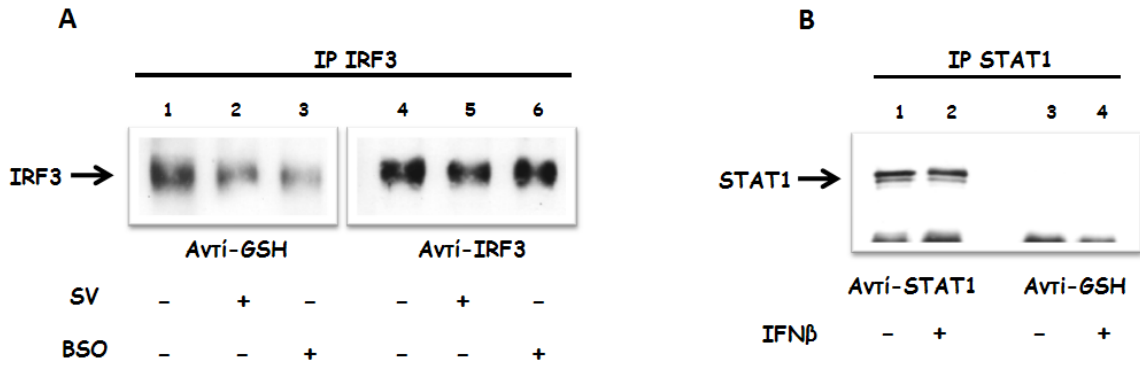
**Εικόνα 45.** Η υποέκφραση της GRX1 μειώνει δραστικά τη μεταγραφή του γονιδίου της IFN $\beta$  μετά τη μόλυνση με ιό.

(A) Ημιοσοτική rt-PCR για την έκφραση της IFN $\beta$  σε TV7 και TGi14 ενεργοποιημένα με ιό ή όχι για 9 h. Το επάνω σχήμα δείχνει την αντίστοιχη έκφραση της GAPDH σε αυτά τα κύτταρα. (B) Real-time PCR για τη γονιδιακή έκφραση της IFN $\beta$  (διάγραμμα αριστερά) και της IL-8 (διάγραμμα δεξιά), στα TV7 και TGi14 κύτταρα μολυσμένα με ιό για 9 h. Και τα δύο πειράματα κανονικοποιήθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές για GAPDH και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μ.ό. της % ποσοστιαίας παραγωγής mRNA $\pm$ s.d. τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. \* $p < 0,05$ .

### 3.2.3.4 GRX1-καταλυόμενη απογλουταθειουλίωση του IRF3 κατά την ιική προσβολή

Η GRX1 είναι ένα συνεχώς ενεργό κυτταροπλασματικό ένζυμο, γνωστό για τον έλεγχο της S-γλουταθειουλίωσης των πρωτεϊνών-στόχων (Gravina S and Mieyal J, 1993; Yang Y et al., 1998). Καθώς ο IRF3 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εντοπίζεται σε λανθάνουσα μορφή στο κυτταρόπλασμα των μη μολυσμένων κυττάρων (Nguyen H et al., 1997), ελέγξαμε αν ο IRF3 ήταν S-γλουταθειουλιωμένος και αν η GRX1 ελέγχει αυτή την τροποποίηση. TV7 κύτταρα προσβλήθηκαν με ιό για 9h ή καλλιεργήθηκαν παρουσία 200 nm BSO για 4 ημέρες ή δεν υπέστησαν τίποτα από τα παραπάνω. Παρασκευάστηκαν κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με αντίσωμα ενάντια στον IRF3 τα οποία ακολουθήθηκαν από ανοσοσύτρωμα κατά Western με αντί-IRF3 και αντί-GSH αντισώματα (**Εικόνα 46Α**). Διαπιστώσαμε ότι ο IRF3 ήταν S-γλουταθειουλιωμένος σε ανενεργή μορφή (**στήλη 1**) και η S-γλουταθειουλίωση μειώθηκε σημαντικά κατά την ιική επαγωγή (**στήλη 2**). Το ποσό του S-γλουταθειουλιωμένου IRF3 μετά την ιική μόλυνση είναι σε παρόμοια επίπεδα με εκείνο των μη-μολυσμένων κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε BSO (**στήλη 3**). Πραγματοποιήθηκε, επίσης, ανοσοκατακρήμνιση με αντί-STAT1 αντίσωμα σε κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα TV7 κυττάρων ενεργοποιημένων ή μη με ανασυνδυασμένη IFNβ, ως πείραμα ελέγχου για την ειδικότητα της S-γλουταθειουλίωσης. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 46B**, δεν παρατηρήθηκε S-γλουταθειουλίωση στο STAT1 υπό κανονικές συνθήκες ή μετά την επαγωγή με IFNβ. Για να εξετάσουμε την ειδικότητα της απογλουταθειουλίωσης του IRF3 μετά την επαγωγή με τον ιό, αξιολογήσαμε την έκταση της απογλουταθειουλίωσης της GAPDH, μίας πρωτεΐνης που έχει αναφερθεί ότι είναι S-γλουταθειουλιωμένη (Lind C et al., 1998). Η GAPDH ανοσοκατακρήμνιστηκε από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα TV7 κυττάρων ενεργοποιημένων με τον ιό για 9 h ή μη και ανοσοσύτρωθηκαν κατά Western με το αντί-GSH αντίσωμα. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη S-γλουταθειουλίωση της GAPDH μετά την ιική επαγωγή (**Εικόνα 46Γ**), γεγονός που υποδηλώνει ότι η δράση της επαγωγής του ιού Sendai στα επίπεδα S-γλουταθειουλίωσης του IRF3 είναι συγκεκριμένη. Η GRX1 ήταν υπεύθυνη για την απογλουταθειουλίωση του IRF3, καθώς το συνολικό ποσό του S-γλουταθειουλιωμένου IRF3 που απογλουταθειουλιώθηκε μετά την ιική επαγωγή στα TG14 κύτταρα ήταν πολύ μικρότερο, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (**Εικόνα 46Δ**).

Στη συνέχεια, αναλύσαμε την κατάσταση γλουταθειουλίωσης του IRF3 που προσδένει σε Bio-ISRE (ολιγονουκλεοτίδια που προσδένουν IRF3) σε πυρηνικά εκχυλίσματα από ενεργοποιημένα από ή μη TV7 κύτταρα. Η πρόσδεση του IRF3 στο Bio-ISRE ολιγονουκλεοτίδιο παρατηρήθηκε σε πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα μολυσμένα με τον ιό (**Εικόνα 46E, στήλες 4 και 5**). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε S-γλουταθειουλίωση στον IRF3 που προσδένει στο DNA (**στήλη 2**). Ο ανοσοκατακρήμνισμένος IRF3 από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα μη-ενεργοποιημένων TV7 κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας για την S-γλουταθειουλίωση (**Εικόνα 46E, στήλη 3**). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο ενεργοποιημένος IRF3 που μπορεί να δεσμεύσει το DNA είναι απογλουταθειουλιωμένος, όμως, από αυτά τα πειράματα, δεν μπορούμε να συμπεράνουμε εάν η γλουταθειουλίωση επηρεάζει την πρόσδεση του IRF3 στο DNA.

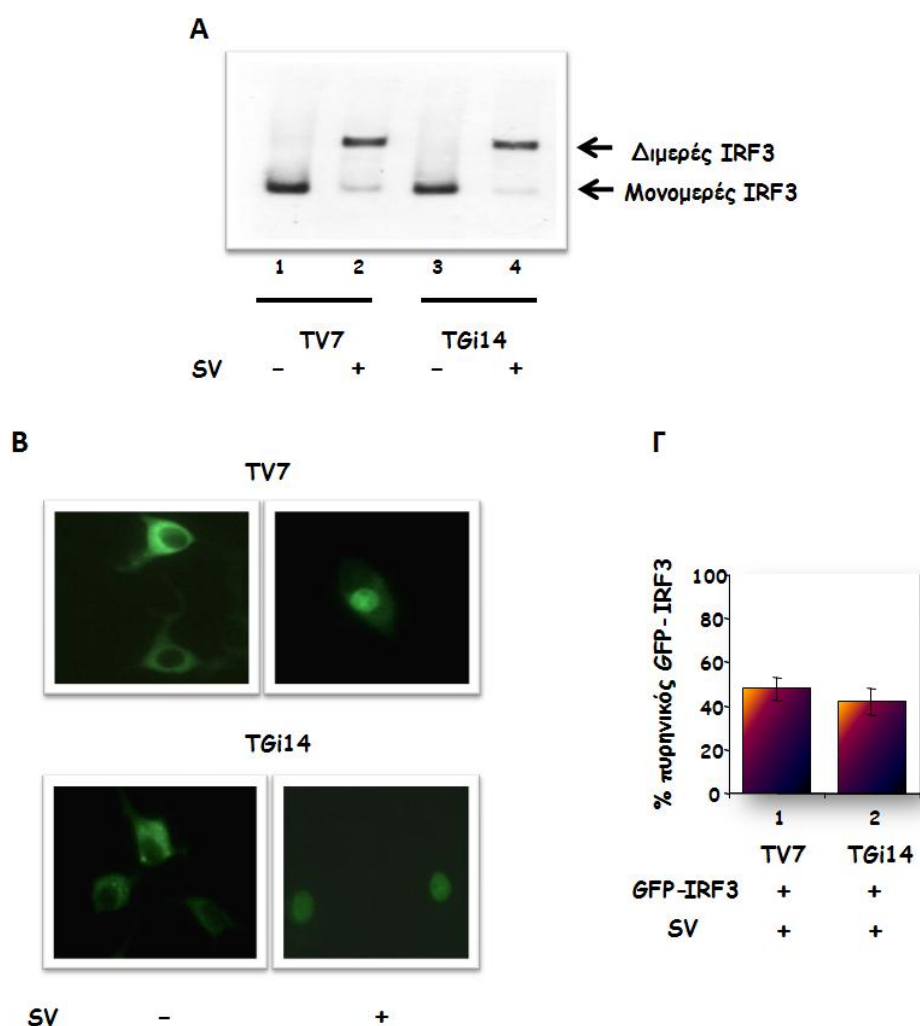


**Εικόνα 46. Ο IRF3 είναι S-γλουταθειονυλιωμένος στην ανενεργή κατάσταση και η κατάσταση γλουταθειονυλίωσης αλλάζει μετά την ιική μόλυνση.**

**(Α)** Ο IRF3 ανοσοκατακρημνίστηκε από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα (300 µg) TV7 κυττάρων χωρίς καμία ενεργοποίηση ή μετά από ενεργοποίηση με τον ιό Sendai virus για 9 h ή μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε θρεπτικό με 200 mM BSO. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοστυπώθηκαν με αντί-IRF3 και αντί-GSH αντισώματα. **(Β)** Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα (300 µg) TV7 κυττάρων με ή χωρίς επαγωγή από IFNβ (500 IU ml<sup>-1</sup>) για 30 min χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση του STAT1. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοστυπώθηκαν με αντί-STAT1 και αντί-GSH αντισώματα. **(Γ)** Ο GAPDH ανοσοκατακρημνίστηκε από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα (300 µg) TV7 κυττάρων με ή χωρίς επαγωγή από Sendai virus για 9 h. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοστυπώθηκαν με αντί-GAPDH και αντί-GSH αντισώματα. **(Δ)** Ο IRF3 ανοσοκατακρημνίστηκε από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα (300 µg) TV7 και TGi14 κυττάρων μη ενεργοποιημένων ή ενεργοποιημένων με Sendai virus για 9 h. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE και ανοσοστυπώθηκαν με αντί-IRF3 και αντί-GSH αντισώματα. **(Ε)** Δίκλωνο βιοτινυλιωμένο-ISRE ολιγονουκλεοτίδιο προσδέθηκε σε μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης. Ίσες ποσότητες πυρηνικών εκχυλισμάτων (100 µg) από TV7 κύτταρα μη ενεργοποιημένων ή ενεργοποιημένων με Sendai virus για 4 h αναμίχθηκαν με τα Bio-ISRE σφαιρίδια παρουσία ή απουσία μεταλλαγμένου ISRE ή αγρίου τύπου ISRE, επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min, πλύθηκαν και διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE. Οι πρωτεΐνες ανοσοστυπώθηκαν με αντί-IRF3 και αντί-GSH αντισώματα. Ανοσοκατακρημνισμένος IRF3 από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα μη ενεργοποιημένων TV7 κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα ελέγχου (στήλες 3 και 9).

### **3.2.3.5 Η GRX1 δε χρειάζεται για το διμερισμό και τη μετάβασή του IRF3 στον πυρήνα**

Η ιογενής μόλυνση ενεργοποιεί τον IRF3 μέσω ενός βιοχημικού καταρράκτη που οδηγεί στη φωσφορυλίωση και τον επακόλουθο διμερισμό του μορίου. Ο ενεργοποιημένος IRF3 εισέρχεται στον πυρήνα, συνδέεται με μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές και προωθεί τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (Lin et al., 1998; Sato et al., 1998; Weaver et al., 1998; Yoneyama et al., 1998). Για να διερευνηθεί κατά πόσον η GRX1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο διμερισμό του IRF3, παρασκευάστηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από TV7 και TGi14 κύτταρα, ενεργοποιημένα ή μη από τον ιό Sendai για 9 ώρες. Τα εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν σε 7,5% μη-αποδιατακτική γέλη και ανοσοστυπώθηκαν με το αντί-IRF3 αντισώμα **(Εικόνα 47Α)**. Η μείωση της έκφρασης της GRX1 στα TGi14 κύτταρα δεν επηρέασε το σχηματισμό του ομοδιμερούς του IRF3 από την ιική επαγωγή **(συγκρίνε στήλες 2 και 4)**.



**Εικόνα 47.** Η μείωση των επιπέδων της GRX1 δεν επηρεάζει το διμερισμό και την πυρηνική μεταβίβαση του IRF3 μετά την ιική μόλυνση.

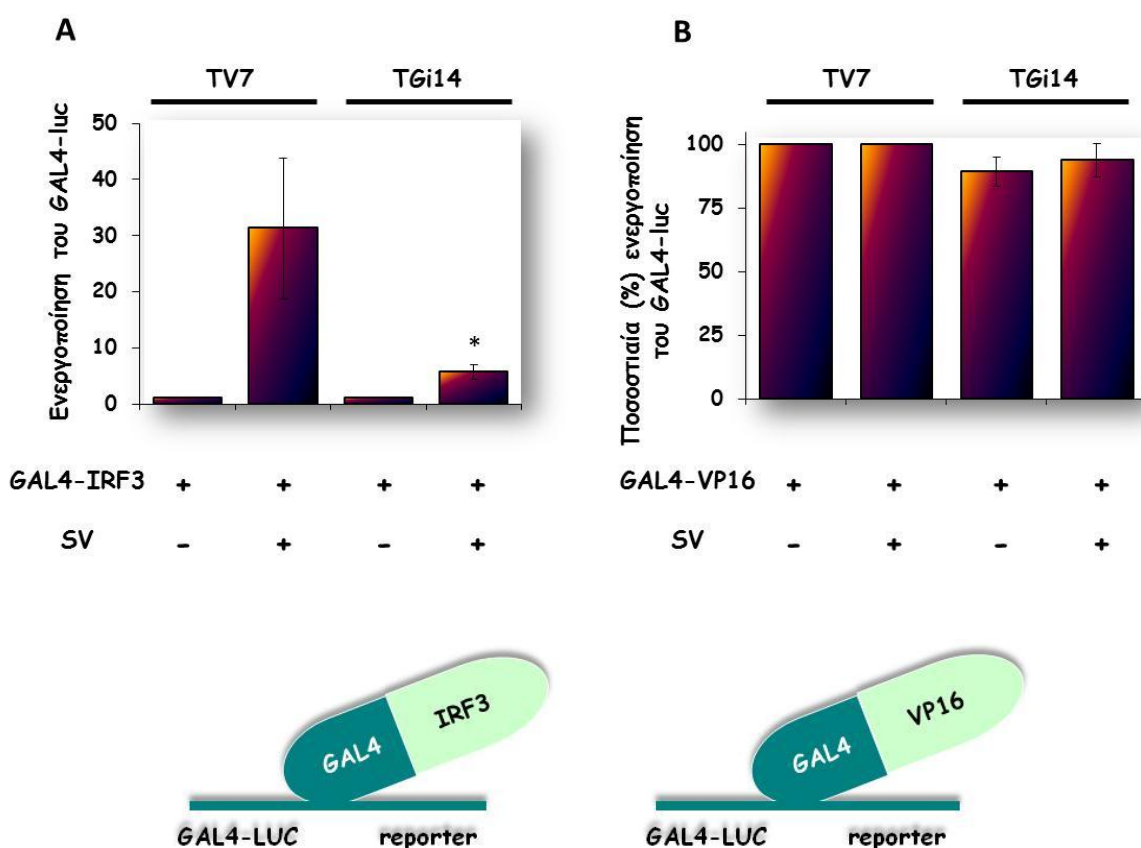
**(Α)** Ανάλυση του IRF3 με ανοσοσύτωση κατά Western σε TV7 και TGi14 κύτταρα ενεργοποιημένα ή μη με ιό Sendai για 9 h. Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (20 μg) διαχωρίστηκαν σε 7,5% μη-αποδιατακτική γέλη ακρυλαμίδης και το ενεργό διμερές του IRF3 είναι ορατό. **(Β)** TV7 και TGi14 κύτταρα επιμολύνθηκαν με GFP-IRF3 (0,5 μg ανά ~300,000 κύτταρα) και διεγέρθηκαν ή όχι με ιό για 16 h. Η πυρηνική μεταβίβαση του GFP-IRF3 μετρήθηκε με μικροσκοπική παρατήρηση 250 ζωντανών κυττάρων σε κάθε «πηγάδι». **(Γ)** Το ποσοστό των κυττάρων στα οποία έχει επαχθεί η πυρηνική μετατόπιση του GFP-IRF3 από τον ιό.

Επιπλέον, τα πειράματα πυρηνικής μετατόπισης που πραγματοποιήθηκαν σε TV7 και TGi14 κύτταρα, επιμολυσμένα με τον GFP-IRF3 και στη συνέχεια ενεργοποιημένα με τον ιό Sendai, δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές στην πυρηνική μεταβίβαση του IRF3 μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών (**Εικόνα 47B και Γ**).

### 3.2.3.6 Η GRX1 είναι απαραίτητη για την ικανότητα του IRF3 να προωθεί τη μεταγραφή

Αφού ο IRF3 μπορεί να ενεργοποιηθεί και να μετατοπιστεί στον πυρήνα ακόμα και παρουσία μειωμένων επιπέδων GRX1, εξετάσαμε αν η απογλυταθεινουλίωση είναι απαραίτητη για την προώθηση της μεταγραφής από τον IRF3.

Επιμολύναμε τις δύο κυτταρικές σειρές με το πλασμίδιο αναφοράς GAL4-luc και το GAL4-IRF3 στο οποίο η περιοχή του IRF3 για την πρόσδεση στο DNA έχει αντικατασταθεί με την αντίστοιχη του GAL4, διασφαλίζοντας έτσι την πρόσδεση στο πλασμίδιο αναφοράς GAL4-luc. Επιπλέον, το πλασμίδιο αυτό φέρει το δικό της σήμα εντοπισμού στον πυρήνα (NLS) για να εγγυηθεί την είσοδο του παράγοντα στον πυρήνα. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 48A**, μετά την ική μόλυνση, η μεταγραφική ενεργοποίηση του GAL4-luc ήταν 80% μικρότερη στα TGi14 κύτταρα σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (**στήλες 2 και 4**), γεγονός που υποδηλώνει ότι η μείωση της GRX1 επηρεάζει την ικανότητα του παράγοντα να προωθήσει τη μεταγραφή μέσω της περιοχής ετερόπλευρης ενεργοποίησης. Για να εξασφαλιστεί ότι η ικανότητα πρόσδεσης των GAL4 κατασκευών δεν επηρεάζεται από τη μείωση της GRX1, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα με GAL4-VP16, έναν ισχυρό ενεργοποιητή της μεταγραφής. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην ενεργοποίηση του GAL4-luc πλασμιδίου αναφοράς μεταξύ των TV7 και των TGi14 κυτταρικών σειρών (**Εικόνα 48B**).



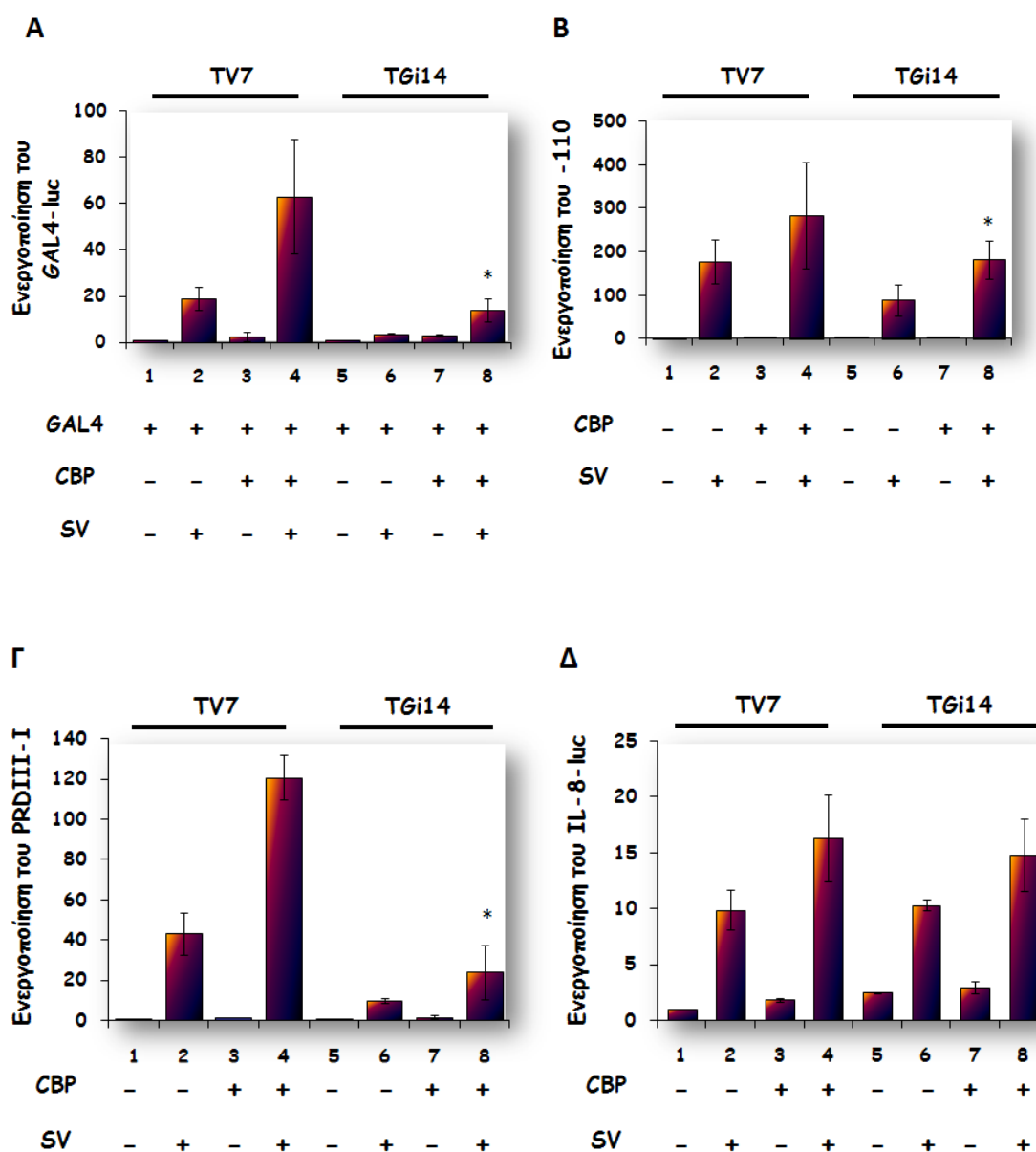
Εικόνα 48. Η GRX-1 επηρεάζει την ικανότητα του IRF3 να προωθεί τη μεταγραφή μέσω της περιοχής του ετερόπλευρης ενεργοποίησης.

**(A)** Μέση ενεργοποίηση του πλασμιδίου αναφοράς GAL4-luc (0,5 µg ανά ~300.000 κύτταρα) σε TV7 και TGi14 κύτταρα επιμολυσμένα και με το GAL4-IRF3 DN133 (0,2 µg ανά ~300.000 κύτταρα) ενεργοποιημένα ή μη με ιό για 9 h. Σε όλα τα πειράματα οι τιμές λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές β-γαλακτοσιδάσης (0,1 µg pGK-β-gal πλασμιδίου αναφοράς ανά ~300.000 κύτταρα). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος±s.d. από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα. **(B)** Μέση ποσοστιαία ενεργοποίηση (%) του GAL4-luc πλασμιδίου αναφοράς (0,5 µg ανά ~300.000 κύτταρα) σε TV7 και TGi14 κύτταρα επιμολυσμένα και με το GAL4-VP16 (0,2 µg ανά ~300.000 κύτταρα) ενεργοποιημένα ή μη με ιό για 9 h. Σε όλα τα πειράματα οι τιμές λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές β-γαλακτοσιδάσης (0,1 µg pGK-β-gal πλασμιδίου αναφοράς ανά ~300.000 κύτταρα). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος±s.d. από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα. \*p<0,05.

### 3.2.3.7 Η απογλουταθειονυλίωση του IRF3 απαιτείται για την αλληλεπίδραση IRF3-CBP

Ο IRF3 φέρει μία υδρόφοβη επιφάνεια, που εκτίθεται κατά τη δημιουργία του διμερούς, προσελκύει το CBP/p300 συν-ενεργοποιητή και λειτουργεί ως περιοχή ετερόπλευρης ενεργοποίησης της μεταγραφής (Qureshi SA et al., 1996). Αφού η GRX1 ήταν απαραίτητη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής από τον IRF3, διερευνήθηκε η πιθανότητα να επηρεάζει την αλληλεπίδραση IRF3-CBP. Για να εξετάσουμε αν η υπερέκφραση του CBP μπορεί να αποκαταστήσει την απώλεια της μεταγραφικής ενεργότητας του IRF3, όταν μειώνονται τα επίπεδα της GRX1, διεξήχθησαν τα πειράματα επιμόλυνσης που περιγράφονται στην **Εικόνα 49**. Όπως ήταν αναμενόμενο, η υπερέκφραση του CBP βελτίωσε τη μεταγραφική ενεργοποίηση όλων των πλασμιδίων αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν (GAL4-luc, PRDIII-I<sub>3</sub>-luc και -110-luc), αλλά δεν μπόρεσε να αποκαταστήσει την ικανότητα ετερόπλευρης ενεργοποίησης της μεταγραφής από τον IRF3 στα TGi14 κύτταρα (**σύγκρινε τις στήλες 4 και 8 στις Εικόνες 49A , B και Γ**). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο IRF3 δεν μπορεί να αλληλεπιδρά αποτελεσματικά με το CBP, αν δεν απογλουταθειονυλιωθεί. Αντίθετα, η μεταγραφική ενεργοποίηση του πλασμιδίου αναφοράς με τον υποκινητή της IL-8 δεν επηρεάστηκε στα TGi14 κύτταρα, δείχνοντας ότι η GRX1 δεν μεταβάλλει την ικανότητα του CBP να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή (**Εικόνα 49Δ, σύγκρινε τις στήλες 4 και 8**).





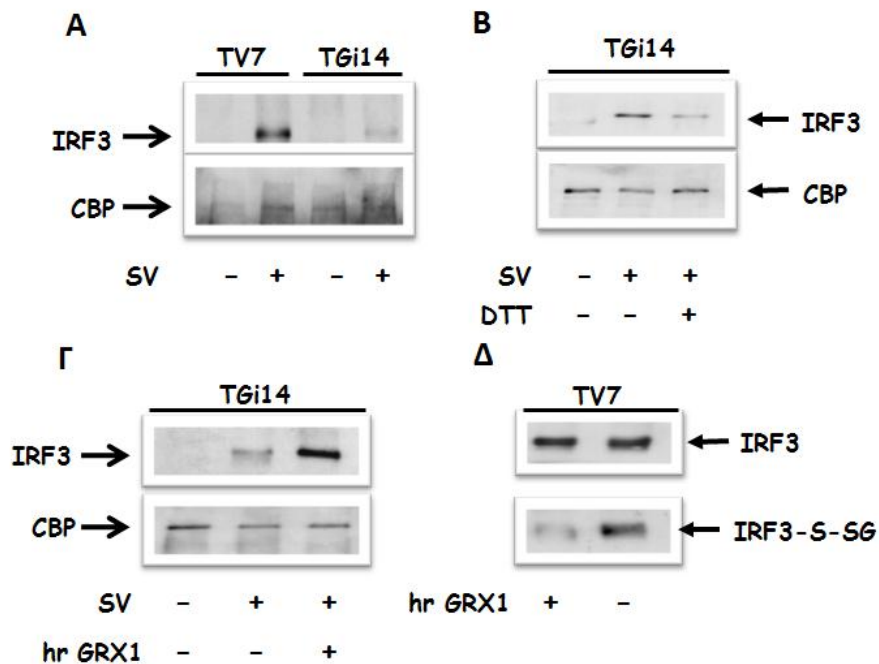
**Εικόνα 49.** Η ενεργοποίηση των πλασμιδίων αναφοράς GAL4-luc, PRDIII-I και -110 στα TV7 και TGi14 κύτταρα κατά την υπερέκφραση του CBP.

Μέση ενεργοποίηση των πλασμιδίων αναφοράς σε TV7 και TGi14 κύτταρα επιμολυσμένα και με το RSV-CBP (0,5 μg ανά ~300.000 κύτταρα) μολυσμένα ή μη με ιό για 9 h. **(Α)** GAL4-luc (0,5 μg ανά ~300.000 κύτταρα) και GAL-4-IRF3 DN133 (0,2 μg ανά ~300.000 κύτταρα), **(Β)** -110-luc (0,3 μg ανά ~300.000 κύτταρα), **(Γ)** PRDIII-I<sub>3</sub>-luc (0,3 μg ανά ~300.000 κύτταρα), **(Δ)** IL-8-luc (0,5 μg ανά ~300.000 κύτταρα). Και στα τέσσερα πειράματα οι τιμές της λουσιφεράσης έχουν κανονικοποιηθεί βάσει της ποσότητας του συνόλου των πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μ.ό.±s.d. από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα. \*p<0,05.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρυθμιστικός ρόλος της GRX1 στην αλληλεπίδραση IRF3-CBP, παρασκευάστηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα από TV7 και TGi14 κύτταρα ενεργοποιημένα για 9

ώρες με τον ιό Sendai, ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντι-CBP αντίσωμα και με Western ανοσοσύτωση ανιχνεύθηκαν ο CBP και ο IRF3.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 50A**, συγκατακρημνίστηκε πολύ λιγότερος IRF3 με το CBP στα μολυσμένα με τον ιό TGi14 κύτταρα από ό,τι στα αντίστοιχα TV7 κύτταρα, αν και τα ποσά του ανοσοκατακρημνισμένου CBP ήταν παρόμοια (**σύγκρινε τις στήλες 6 και 8**). Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η GRX1 ήταν αναγκαία για την αποτελεσματική αλληλεπίδραση του CBP με τον ενεργοποιημένο IRF3 στα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρατήρηση ότι ο S-γλουταθειονυλιωμένος IRF3 δεν δεσμεύει το CBP, επεξεργαστήκαμε πυρηνικά εκχυλίσματα από TGi14 κύτταρα μολυσμένα ή μη από τον ιό με DTT (μη-ειδικό αναγωγικό των δισουλφιδικών δεσμών) ή με καθαρισμένη hrGRX-1 πριν από την ανοσοκατακρήμνιση με CBP. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 50B**, η επεξεργασία με DTT είχε ως αποτέλεσμα την ακόμα μικρότερη από κοινού κατακρήμνιση του IRF3 με το CBP (**σύγκρινε τις στήλες 5 και 6**), γεγονός που υποδηλώνει ότι ορισμένοι δισουλφιδικοί δεσμοί απαιτούνται για την αποτελεσματική αλληλεπίδραση μεταξύ CBP και ενεργοποιημένου IRF3. Αντίθετα, μετά την επεξεργασία με GRX1, η συγκατακρήμνιση IRF3 αυξήθηκε έντονα στα μολυσμένα από τον ιό πυρηνικά εκχυλίσματα (**Εικόνα 50Γ, σύγκρινε τις στήλες 5 και 6**). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η απογλουταθειονυλίωση του IRF3 απαιτείται για την αποτελεσματική αλληλεπίδρασή του με το CBP. Στο πείραμα ελέγχου δείξαμε ότι η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη GRX1 (hr GRX1) μπορεί να απογλουταθειονυλιώσει τον IRF3 υπό πειραματικές συνθήκες (**Εικόνα 50Δ**).



**Εικόνα 50.** Η μείωση των επιπέδων της GRX1 επηρεάζει την αλληλεπίδραση IRF3–CBP.

(A) Ανοσοκατακρήμνιση του CBP από πυρηνικά εκχυλίσματα (150 mg) TV7 και TGi14 κυττάρων μολυσμένων ή μη με ιό για 9 h. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με SDS–PAGE και ανιχνεύτηκαν με αντί-IRF3 και αντί-CBP αντισώματα. (B) Ανοσοκατακρήμνιση του CBP από πυρηνικά εκχυλίσματα (300 mg) επεξεργασμένα ή μη με DTT (10mM για 15 min στους 25°C) από TGi14 κύτταρα

ενεργοποιημένα ή μη με ιό για 9 h. Οι πρωτεΐνες ανοσοστυπώθηκαν κατά Western με αντι-IRF3 και αντι-CBP αντισώματα. **(Γ)** Ανοσοκατακρήμνιση του CBP από πυρηνικά εκχυλίσματα (300 mg) επεξεργασμένα ή μη με hGRX1 (400 mg/ml για 15 min στους 25°C) από TG14 κύτταρα ενεργοποιημένα ή μη με ιό για 9 h. Οι πρωτεΐνες ανοσοστυπώθηκαν κατά Western με αντι-IRF3 και αντι-CBP αντισώματα. **(Δ)** Ανοσοκατακρήμνιση του IRF3 από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα (300 mg) επεξεργασμένα ή μη με hr GRX1 (400 mg/ml για 15 min στους 25°C) TV7 κυττάρων. Οι πρωτεΐνες ανοσοστυπώθηκαν κατά Western με αντι-IRF3 και αντι-GSH αντισώματα.

### 3.2.3.8 Σε ποια κυστεΐνη λαμβάνει χώρα η γλουταθειονυλίωση?

Ο ρόλος των κυστεϊνών στη δράση της ετερόπλευρης ενεργοποίησης του IRF3 διερευνήθηκε με πειράματα επιμόλυνσης μεταλλαγμένων μορφών του IRF3 που έφεραν αντικαταστάσεις κυστεΐνης σε σερίνη. Κατασκευάσαμε έξι σημειακά μεταλλαγμένες μορφές για κάθε μία από τις κυστεΐνες του IRF3 (C167S, C222S, C267S, C289S, C347S and C371S) και αναλύσαμε τα επίπεδα γλουταθειονυλίωσης αυτών των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης από επιμολυσμένα TV7 κύτταρα. Όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες βρέθηκαν S-γλουταθειονυλιωμένες, υποδεικνύοντας ότι υπάρχουν περισσότερες από μία γλουταθειονυλιωμένες κυστεΐνες στο μόριο.

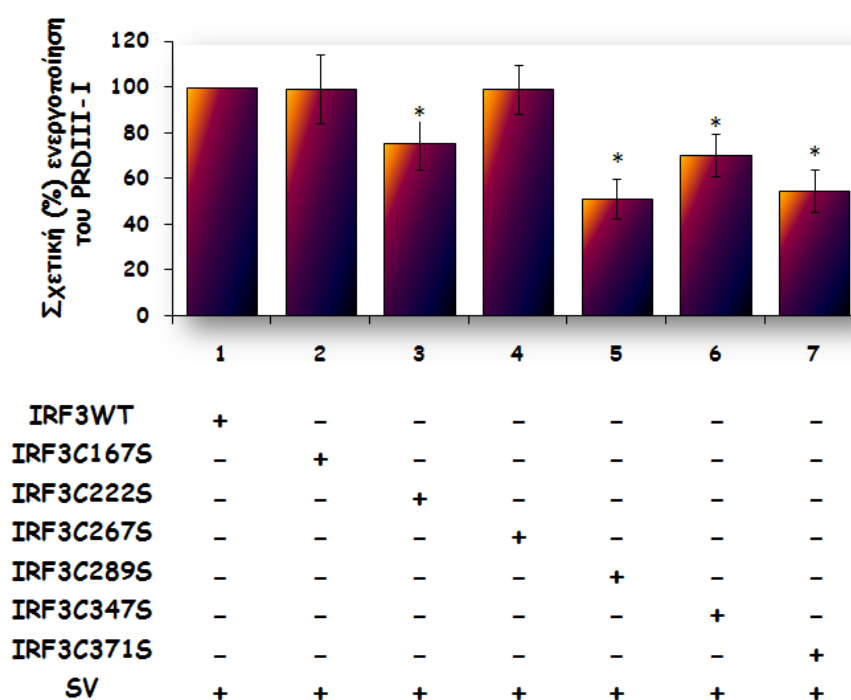
1 mgtrkprilp wlvsqldlgq legnavwnks rtrfripwkh glrqdaqged fgifqawaea  
 61 tgaavnprdk pdlptwkrnf rsalnркеgl rlaedrskdp hdpkhiyefv nsgvgdfsqp  
 121 dtspdtnggg stsdtdedil dellgnmvl a plpdrppsl avapepсpqp lrspsldnpt  
 181 pfpnlgpsen plkrllvpge ewefevtafy rgrqvfqqtі scpeglrlvg sevgdrtlpg  
 241 wpvnlpdrpm sltdrgvmsy vrhvlscldg glalwragqw lwaqrldghch tywavseell  
 301 pnsghgpdge vpkdkeggvf dlgpfvldli tftegsgrsp ryalwfсvge swpqdqrwtk  
 361 rlvnkvkvnpt clralvemar vggasslent vdlhisnshp lsitsdqyka yldlvegmd  
 421 fqgpges

**Εικόνα 51.** Η αμινοξική αλληλουχία του IRF3 στον άνθρωπο (NP\_001562).

Έχουν σημειωθεί οι κυστεΐνες του μορίου.

Επίσης, ελέγξαμε την ικανότητα ετερόπλευρης ενεργοποίησης της μεταγραφής σε πειράματα επιμόλυνσης σε TV7 και TG14 κύτταρα. Στα TV7 κύτταρα, οι μεταλλαγές C164S και C267S είχαν την ίδια ικανότητα ετερόπλευρης ενεργοποίησης της μεταγραφής με τον άγριου τύπου IRF3. Η μεταλλαγή των κυστεϊνών 222 ή 347 οδήγησε σε 25 και 30% μικρότερη ενεργοποίηση, αντίστοιχα. Τέλος, η μεταλλαγή των κυστεϊνών 289 ή 371 οδήγησε σε 50% μείωση της ικανότητας ετερόπλευρης ενεργοποίησης της μεταγραφής, αντίστοιχα (**Εικόνα 52**). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι περισσότερες της μίας κυστεΐνης μπορεί να εμπλέκονται

στην ικανότητα του IRF3 να ενεργοποιεί τη μεταγραφή, ενδεχομένως μέσω ενός δικτύου δεσμών θείου.



**Εικόνα 52.** Ικανότητα ετερόπλευρης ενεργοποίησης των διαφόρων μορφών μεταλλαγμένου **IRF3**. Μέση ποσοστιαία μεταγραφική ενεργοποίηση (%) του πλασμιδίου αναφοράς PRDIII-I<sub>3</sub>-luc (0,3μg ανά ~300.000 κύτταρα) σε TV7 (πίνακας δεξιά) και TGI14 κύτταρα (πίνακας αριστερά), επιμολυσμένα με αγρίου τύπου (WT) IRF3 ή με μεταλλάξεις του (04μg ανά ~300.000 κύτταρα) και ενεργοποιημένα με ιό Sendai για 6h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μ.ό.±sd από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα. Με ανοσοσύτωση κατά Western εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των μεταλλαγμένων IRF3 και βρέθηκαν ίδια.

συζήτηση



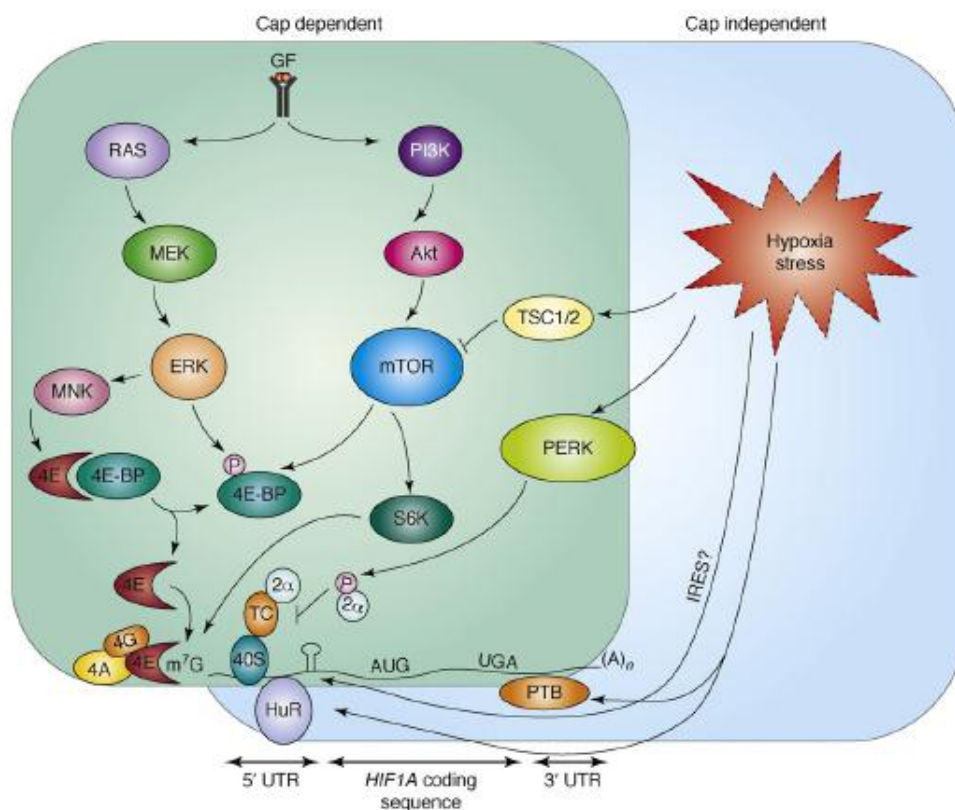
Τα συστήματα της θειορεδοξίνης και της γλουταρεδοξίνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική άμυνα ενάντια στο οξειδωτικό στρες και στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης λόγω της ρύθμισης της ανταλλαγής θειόλης-δισουλφιδίου. Οι ισομορφές της θειορεδοξίνης TRX1 (κυτταροπλασματική μορφή) και TRX2 (μιτοχονδριακή μορφή) μπορούν να ανάγουν ενδο-και διαμοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς πρωτεϊνών, κυρίως περοξυρεδοξινών, που διασπών οργανικά υδροπεροξειδία,  $H_2O_2$  και περοξυνιτρικό. Η NADPH-εξαρτώμενη αναγωγή της θειορεδοξίνης, η οποία ανάγει ένα εύρος υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένης της οξειδωμένης μορφής της θειορεδοξίνης, μπορεί επίσης να ανάγει άμεσα λιπιδικά υδροπεροξειδία,  $H_2O_2$ , το διϋδροασκορβικό και το λιποϊκό οξύ. Η γλουταρεδοξίνη, της οποίας οι κύριες ισομορφές στα θηλαστικά είναι οι GRX1, GRX2, GRX3 και GRX5, δρα μέσω ενός μηχανισμού παρόμοιου με της θειορεδοξίνης και συντελεί και αυτή στη διατήρηση του αναγωγικού περιβάλλοντος ενδοκυττάρια. Σε αντίθεση, όμως, με τη θειορεδοξίνη, η γλουταρεδοξίνη ανάγει μικτά δισουλφίδια με GSH και καταλύει την αντίδραση όχι μόνο μέσω του διθειολικού μηχανισμού, αλλά και μέσω της μονοθειολικής αναγωγής (**βλέπε κεφάλαιο 1.2.2**). Εκτός από το ρόλο τους στην αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου, οι παραπάνω πρωτεΐνες διαδραματίζουν πληθώρα σημαντικών λειτουργιών που απαιτούνται για την επιβίωση του κυττάρου: ρυθμίζουν τις ενεργότητες μεταγραφικών παραγόντων, λειτουργούν ως ενζυμικοί συμπαράγοντες, λαμβάνουν μέρος στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και εμπλέκονται σε αντιαποπτωτικούς μηχανισμούς.

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάδειξη του ρόλου μελών της υπεροικογένειας των θειορεδοξινών σε διαφορετικά είδη στρες.

#### 4.1 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΗΣ ΚΑΙ Η ΝΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ HIF-1α

Τα τελευταία 15 χρόνια έχουν δημοσιευτεί αρκετές έρευνες που εμπλέκουν το σύστημα της θειορεδοξίνης στην ενεργοποίηση του HIF-1. Για παράδειγμα, έχει δειχτεί ότι η υπερέκφραση της TRX1 προωθεί τη δράση του HIF-1 (Ema M et al., 1999; Huang LE et al., 1996; Zhou J et al., 2007) και κινητοποιεί την αύξηση της HIF-1α πρωτεΐνης τόσο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου όσο και σε υποξικές (Welsh SJ et al., 2002; Zhou J et al., 2007). Παράλληλα, η εξασθένηση της ενεργότητας της TRXR1 εμποδίζει την *trans* ενεργοποίηση της μεταγραφής από το HIF-1 (Moos PJ et al., 2003). Από την άλλη, η TRX2 φαίνεται να εμποδίζει τη μετάφραση της HIF-1α υπομονάδας (Zhou J et al., 2007). Τέλος, η υπερέκφραση της TRX2 αλλοιώνει το επίπεδο των ROS, το οποίο ως γνωστόν επηρεάζει τη σηματοδότηση από το NO (Kohl R et al., 2006; Thomas DD et al., 2006). Θελήσαμε, λοιπόν, να εξακριβώσουμε εάν η TRX1 ή η TRX2 επηρεάζει την ενεργοποίηση της HIF-1α από το NO.

Οι δότες NO μπορούν να χρησιμοποιήσουν διακριτά μονοπάτια για να επηρεάσουν τα επίπεδα της HIF-1α, τα οποία εξαρτώνται είτε από τη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται είτε από τον κυτταρικό τύπο. Οι υψηλές συγκεντρώσεις NO μειώνουν την ουβικιτίνωση και την υδροξυλίωση της HIF-1α, εμποδίζουν την πρόσδεση του pVHL στη συγκεκριμένη υπομονάδα και, τελικά, τη σταθεροποιούν (Metzen E et al., 2003). Από την άλλη, οι χαμηλές συγκεντρώσεις NO είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε συσσώρευση HIF-1α λόγω ενίσχυσης της σύνθεσής της μέσω του μονοπατιού PI3K ή MAPK (Kasuno K et al., 2004) (**Εικόνα 53**).



**Εικόνα 53. Σημαντικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη μετάφραση της HIF-1α.**

Υπό συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου το mRNA της HIF-1α μεταφράζεται μέσω μηχανισμών που εξαρτώνται από το κάλυμμα (cap-dependent translation). Σε συγκεκριμένες κυτταρικές συνθήκες η μετάφραση της παραπάνω υπομονάδας μπορεί να κινητοποιηθεί από αναπτυξιακούς παράγοντες (GFs), ογκοπρωτεΐνες ή κυτοκίνες που ενεργοποιούν τα μονοπάτια των PI3K-Akt-mTOR και των MAPK (RAS-MEK-ERK). Έχει προταθεί ότι κατά την υποξία η HIF-1α μπορεί να μεταφρασθεί και μέσω ενός μηχανισμού που δεν εξαρτάται από το κάλυμμα (cap-independent translation), πιθανότατα μέσω του IRES (Koh MY et al., 2008).

PTB: πρωτεΐνη που δένει σε πολυυριμιδίνη, TSC: σύμπλοκο οξώδους σκλήρυνσης, PERK: κινάση του ενδοπλασματικού δικτύου που μοιάζει με την PKR, MNK: κινάσες που ενσωματώνουν το MAPK σινιάλο, TC: τριμερές σύμπλοκο.

Ο δότης NO που χρησιμοποιείται στα πειράματά μας δεν επηρεάζει την κατάσταση φωσφορυλίωσης των MAPK ή p70S6K σε σύγκριση με το μάρτυρα, συνεπώς το NO φαίνεται να επεμβαίνει στην ενεργότητα που έχει η PHD να αναστέλλει την αποικοδόμηση της HIF-1α και άρα συσσωρεύεται η πρωτεΐνη. Οι μεταβολές στην έκφραση των θειορεδοξινών επηρεάζουν τη βασική ενεργότητα των MAPK και p70S6K, που συνεισφέρει στον έλεγχο της μετάφρασης του mRNA της HIF-1α, χωρίς ωστόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες να προκαλεί σταθεροποίηση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, πιθανότατα επειδή η αποικοδόμηση της HIF-1α συνεχίζει να υπερβαίνει τους βασικούς ρυθμούς πρωτεϊνικής συσσώρευσης. Παρόλα αυτά, κάποια αλλαγή στη μετάφραση της HIF-1α γίνεται εμφανής, όταν ο δότης NO παρεμβαίνει στην αποικοδόμησή της. Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώσαμε ότι η κυτταροπλασματική TRX1 ενισχύει τη συσσώρευση της HIF-1α ως απόκριση στο NO που παράγεται από το GSNO ή ενδογενώς μέσω της NO-



συνθετάσης. Από την άλλη οι μιτοχονδριακές TRX2 ή TRXR2 έχουν την αντίθετη δράση. Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαίωσαν προηγούμενες μελέτες που έδειχναν ότι η TRX1 αυξάνει τη μετάφραση της HIF-1α, ενώ η TRX2 μετριάζει αυτή τη διαδικασία (Zhou J et al., 2007). Εδώ παρέχουμε πρόσθετες πληροφορίες πως όχι μόνο η TRX2, αλλά και η TRXR2 μειώνει τη μετάφραση της HIF-1α. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι οι p42/44 MAPK και p70S6K εμπλέκονται ουσιαστικά στη ρύθμιση της μετάφρασης της παραπάνω υπομονάδας από τις θειορεδοξίνες. Ενώ οι ενεργότητες των p42/44 MAPK και p70S6K ενισχύονται στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την TRX1, μειώνονται σε εκείνα που υπερεκφράζουν την TRX2 ή την TRXR2. Μία σχέση αιτίας-αποτελέσματος αποκαλύφθηκε, όταν η αύξηση της ενεργότητας της MAPK στα TRX2 κύτταρα αποκατέστησε τη λειτουργική απόκριση στο NO. Τέλος, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι το ενδοκυττάριο ATP αυξάνει στα TRX1 κύτταρα, ενώ μειώνεται στα TRX2 και TRXR2. Σημειώνεται εδώ ότι η μείωση του ATP οδηγεί σε ελάττωση της συσσώρευσης της HIF-1α. Το γεγονός ότι η προσθήκη NO άφησε αναλλοίωτα τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP υποδεικνύει πως η συγκέντρωσή του ρυθμίζεται μάλλον από τις θειορεδοξίνες και όχι από το NO.

Είναι γνωστό ότι η TRX1 αυξάνει τα επίπεδα της HIF-1α (Welsh SJ et al., 2002). Στην παρούσα εργασία δείξαμε ότι σε συνθήκες υποξίας η TRX1 ενισχύει την εξαρτώμενη από το κάλυμμα μετάφραση (cap-dependent translation) μέσω της ενεργοποίησης των Akt, p70S6K, eIF-4E και 4EBP-1 και κατά αυτόν τον τρόπο προωθεί τη μετάφραση της HIF-1α, ενώ η TRX2 έχει την αντίθετη δράση (Zhou J et al., 2007). Συσσώρευση της HIF-1α λόγω αυξημένου ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης παρατηρείται συχνά μετά τη δράση αναπτυξιακών παραγόντων ή κυτοκινών ή σε κύτταρα που φέρουν ογκογονίδια με μεταλλάξεις που οδηγούν σε νέα ή ενισχυμένη λειτουργία (Semenza GL, 2003). Συχνά, το μονοπάτι των MAPK επηρεάζει την έκφραση της HIF-1α μετά τη δράση αναπτυξιακών παραγόντων, όπως της ινσουλίνης και του HER2 (neu) (Fukuda R et al., 2002; Laughner E et al., 2001). Εμείς προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε αλλαγές στην ενεργότητα της p42/44 MAPK σε κύτταρα που υπερεκφράζουν τις TRX1, TRX2 και TRXR2. Όμοια με της AKT (Zhou J et al., 2007), η φωσφορυλίωση της p42/p44 MAPK αυξάνεται, όταν υπερεκφράζεται η TRX1, ενώ μειώνεται με την υπερέκφραση των TRX2 ή TRXR2. Η ανασύσταση της MAPK με ενισχυμένη λειτουργικότητα στα TRX2 κύτταρα αποκατέστησε τη NO-προκαλούμενη συσσώρευση της HIF-1α και έτσι, αποδεικνύεται η σημασία της MAPK για τις λειτουργικές HIF-1 αποκρίσεις. Οι μηχανισμοί μεταφραστικού ελέγχου της θειορεδοξίνης που επηρεάζουν την έκφραση της HIF-1α περιλαμβάνουν αυξημένες ενεργότητες των AKT, p70S6K, eIF-4E και 4EBP-1 και με τα νέα δεδομένα η MAPK μπορεί να προστεθεί στη λίστα. Είναι γνωστό ότι αλλαγές στην ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική κατάσταση επηρεάζουν την έκφραση της HIF-1α. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι θειορεδοξίνες είναι σημαντικά οξειδοαναγωγικά συστατικά που ανιχνεύουν και αποκρίνονται στις αλλαγές αυτές στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια, είναι πλέον δυνατόν να συνδεθεί η ενεργότητα των οξειδοαναγωγικών ανιχνευτών με μηχανισμούς ελέγχου της μετάφρασης. Αυτό μπορεί να συντελέσει στην καλύτερη κατανόηση του συντονισμού των HIF-1α αποκρίσεων και παρέχει μοριακούς στόχους, όπως τις θειορεδοξίνες, που ελέγχουν αυτές τις αποκρίσεις. Εάν και ο τρόπος με τον οποίον οι θειορεδοξίνες ελέγχουν τη μετάφραση της HIF-1α χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, η ρύθμιση των επιπέδων του ATP ενδεχομένως να προσφέρει μία εξήγηση. Είναι γνωστό ότι η πρωτεϊνοσύνθεση είναι μία διαδικασία υψηλής κατανάλωσης ενέργειας. Τα αυξημένα επίπεδα ATP που παρατηρούνται στα TRX1 κύτταρα, σε αντίθεση με τα μειωμένα επίπεδα των TRX2 κυττάρων, μπορεί να

υποδεικνύουν μία παρεμβολή στο σχηματισμό του πολυπεπτιδίου. Πειράματα με ολιγομυκίνη για τη μείωση του ATP στα TRX1 κύτταρα οδήγησαν, πράγματι, σε μείωση της συσσώρευσης της HIF-1α παρουσία GSNO και επιβεβαίωσαν τη σημασία του ATP στην πρωτεϊνοσύνθεση. Μπορεί να υποτεθεί ότι η μείωση του ATP στα TRX2 κύτταρα οδηγεί σε ενεργοποίηση της AMP-ενεργοποιούμενης πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK), που είναι γνωστό ότι επηρεάζει το στόχο της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά (mammalian target of rapamycin, mTOR) και τους τελεστές του, 4EBP-1 και p70S6K, μειώνοντας έτσι την έκφραση της HIF-1α υπό φυσιολογικές συνθήκες (Brugarolas J and Kaelin WG Jr, 2004). Ωστόσο, στην περίπτωση της οξείας υποξίας, η AMPK αποκλείστηκε από τη ρύθμιση του mTOR και της πρωτεϊνοσύνθεσης (Brugarolas J et al., 2004). Παρά το γεγονός ότι λείπει μία σχέση αιτίας-αποτελέσματος σε αυτό το σημείο, τα δεδομένα μας υποδηλώνουν ότι οι θειορεδοξίνες επηρεάζουν τη μετάφραση της HIF-1α ρυθμίζοντας το ATP. Προφανώς, η μετάφραση της HIF-1α είναι πιο ευαίσθητη στις διακυμάνσεις του ATP σε σύγκριση με άλλες πρωτεΐνες, αφού η ολική πρωτεϊνοσύνθεση (υπολογιζόμενη με σήμανση με [35S]μεθειονίνη) δεν επηρεάζεται στα TRX1 κύτταρα σε σχέση με τα TRX2. Έχει δειχθεί ότι τα κύτταρα που υπερεκφράζουν την TRX2 παρουσιάζουν σχεδόν διπλάσια αύξηση στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης ( $\Delta\psi_m$ ) (Damdimopoulos AE et al., 2002). Προκειμένου να καθορίσουμε εάν η TRX2 μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση του  $\Delta\psi_m$  μέσω της ATP-συνθετάσης, η οποία και συμμετέχει στη ρύθμιση αυτού του δυναμικού (Buckman JF and Reynolds JJ, 2001), χορηγήσαμε στα συγκεκριμένα κύτταρα ολιγομυκίνη και παρατηρήσαμε ότι είναι πιο ευαίσθητα από τα κύτταρα-μάρτυρες στην αναστολή της ATP-συνθετάσης. Τα ανωτέρω αποτελέσματα, λοιπόν, συναινούν στο ότι η υπερέκφραση της TRX2 μπορεί να ρυθμίσει την ενεργότητα της ATP-συνθετάσης. Ο μηχανισμός πίσω από αυτή τη ρύθμιση δεν είναι γνωστός, ενδεχομένως, πάντως, να περιλαμβάνει άμεση ή έμμεση ρύθμιση των θειολών της ATP-συνθετάσης. Η πρωτεΐνη αυτή στους χλωροπλάστες ρυθμίζεται μέσω θειόλης λόγω ενός μοτίβου 9 αμινοξέων που περιλαμβάνουν 2 κυστεΐνες στη  $\gamma$  υπομονάδα του χλωροπλάστη F1. Αφού αυτό το αμινοξικό τμήμα βρίσκεται μόνο στα ανώτερα φυτά (Miki J et al., 1998), η δράση της TRX2 μπορεί να είναι έμμεση και να μην ανάγει τις θειόλες στις πρωτεΐνες που συνιστούν την ATP-συνθετάση, αλλά να μεσολαβεί στη λειτουργία του Παράγοντα B (Belogradon GI and Hatefi Y, 2002). Ο Παράγοντας B είναι ένας ενεργοποιητής/ρυθμιστής της ATP συνθετάσης και αναστέλλεται από αντιδραστήρια που τροποποιούν μονοθειόλες και κυρίως διθειόλες. Οπότε, η TRX2, ανάγοντας τον Παράγοντα B, θα μπορούσε να επηρεάσει την ενεργότητα της ATP-συνθετάσης. Εκτός της ATPάσης, ένας άλλος μηχανισμός τον οποίον η TRX2 μπορεί να χρησιμοποιεί για να επηρεάσει τη μιτοχονδριακή λειτουργία είναι η ρύθμιση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών.

Σε ένα ευρύτερο πλάνο, τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να βοηθήσουν στη διερεύνηση του τρόπου μέσω του οποίου το NO το οποίο παρέχεται από χημικά διαφορετικούς δότες ή δημιουργείται από την επαγόμενη NO συνθετάση μπορεί να επηρεάσει τη HIF-1α. Υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές σχετικά με το αν το NO προκαλεί τη συσσώρευση της HIF-1α ή την αποικοδόμησή της. Έχει προταθεί ότι το NO παρεμβαίνει στην ενεργότητα της PHD να σταθεροποιεί τη HIF-1α υπό φυσιολογικές συνθήκες, ενώ μειώνει τα επίπεδά της HIF-1α πρωτεΐνης στην υποξία (Bróne B and Zhou J, 2003). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η SIN-1 εμποδίζει τη συσσώρευση της HIF-1α, ενώ το GSNO την επάγει (Wellman TL et al., 2004). Τα αποτελέσματά μας από κύτταρα που υπερεκφράζουν τη θειορεδοξίνη υπογραμμίζουν ότι οι

αλλαγές στο οξειδοαναγωγικό περιβάλλον, που προκαλούνται από την υπερέκφραση των θειορεδοξινών, μάλλον επηρεάζουν την πρωτεϊνοσύνθεση της HIF-1α και όχι τη δυνατότητα του NO να σταθεροποιεί τα πρωτεϊνικά της επίπεδα. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για να διερευνηθεί πώς οι οξειδοαναγωγικές αλλαγές, που ανιχνεύονται και μεταβιβάζονται από τις θειορεδοξίνες, επιδρούν στην ικανότητα των NO-δοτών να προκαλούν διακριτές HIF-1α αποκρίσεις. Μπορεί να προβλεφθεί ότι το επίπεδο του NO ή/ και οι ρυθμοί αντισταθμιστικής ροής της ελεύθερης ρίζας του υπεροξειδίου επηρεάζουν το ενδοκυττάριο οξειδοαναγωγικό περιβάλλον, όπως και οι θειορεδοξίνες και άρα τη συσσώρευση της HIF-1α. Ο οξειδοαναγωγικός έλεγχος της πρωτεϊνικής μετάφρασης της HIF-1α ενδέχεται να είναι σημαντικός για έναν αριθμό παθολογικών καταστάσεων, όπως για τη φλεγμονή ή τον καρκίνο, στη δυσλειτουργία των οποίων συνεισφέρει ο HIF-1.

## **4.2 GRX1, ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΑΝΟΣΙΑ**

Η S-γλουταθειονυλίωση αποτελεί μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση κατά την οποία η σουλφυδρυλ-ομάδα της κυστεΐνης της GSH σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με τη σουλφυδρυλ-ομάδα μίας πρωτεϊνικής κυστεΐνης και αποτελεί έναν μηχανισμό αντιστρεπτής οξειδοαναγωγικής ρύθμισης της πρωτεϊνικής ενεργότητας και της κυτταρικής σηματοδότησης (Gallogly MM and Mieyal JJ, 2007; Shelton MD et al., 2005). Κάποιες πρωτεΐνες παραμένουν γλουταθειονυλιωμένες στο αναγωγικό περιβάλλον του κυττάρου, ενώ η γλουταθειονυλίωση κάποιων άλλων λαμβάνει χώρα μετά το κατάλληλο ερέθισμα (Mieyal JJ et al., 2008). Έχει αποδειχτεί ότι η GRX συνιστά έναν αποτελεσματικό και ειδικό καταλύτη της απογλουταθειονυλίωσης (Chrestensen, 2000; Gravina S and Mieyal J, 1993; Thomas JA et al., 1995; Yang Y et al., 1998). Ο καταλυτικός μηχανισμός της γλουταθειονυλίωσης δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα, εάν και έχει αποδοθεί σε αρκετά ένζυμα, συμπεριλαμβανομένης και της GRX υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Gallogly MM and Mieyal JJ, 2007). Η φυσιολογική και παθολογική συσχέτιση της GRX και της γλουταθειονυλίωσης αποδεικνύεται από την πρόσφατη έξαρση των αντίστοιχων άρθρων στο PubMed (Shelton MD and Mieyal JJ, 2008).

Η GRX και η γλουταθειονυλίωση έχουν εμπλακεί σε αρκετές νόσους που περιλαμβάνουν φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές (π.χ. στο διαβήτη, στη φλεγμονώδη πνευμονική νόσο, στον καρκίνο και στη νευροεκφυλιστική ασθένεια του Alzheimer) (Shelton MD and Mieyal JJ, 2008). Ωστόσο, τα ευρήματα δεν είναι αρκετά σαφή για να καθοριστεί εάν η GRX συνιστά αποτελεσματικό θεραπευτικό στόχο. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της GRX1 στο μονοπάτι των IL-1R1/TLR4 και στην ιική επαγωγή από το Sendai virus.

### **4.2.1 Η GRX1 εμπλέκεται στη σηματοδότηση των IL-1R/TLR4**

Έχει βρεθεί ότι η GRX1 των θηλαστικών ελέγχει την απογλουταθειονυλίωση αρκετών τέτοιων πρωτεϊνών με τρόπο ειδικό για το υπόστρωμα (Fernandes AP and Holmgren A, 2004; Gravina S and Mieyal J, 1993) και θεωρείται πλέον ένα ένζυμο που ρυθμίζει τη μεταγωγή σήματος. Η λειτουργία της GRX1 βασίζεται στην παρουσία γλουταθειόνης. Όταν το ένζυμο απογλουταθειονυλιώνει ένα S-γλουταθειονυλιωμένο υπόστρωμα, δημιουργείται ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο GRX1-SSG (Gravina S and Mieyal J, 1993; Yang Y et al., 1998). Η ελεύθερη γλουταθειόνη ανάγει το ενδιάμεσο σύμπλοκο και «ξαναγεμίζει» την GRX1 για να συνεχίσει την κατάλυση (Yang Y et al., 1998). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, τα αποτελέσματά μας απέδειξαν

ότι η επαγόμενη από την υπερέκφραση του TRAF6 ενεργοποίηση του NF-κΒ ελαττώνεται παρουσία BSO, υποδεικνύοντας την ανάγκη για γλουταθειόνη στη σηματοδότηση που μεσολαβείται από τον TRAF6. Επιπλέον, κύτταρα με μειωμένα επίπεδα GRX1 είναι 45-63% λιγότερο αποτελεσματικά στην ετερόπλευρη (*trans*) ενεργοποίηση του NF-κΒ-εξαρτώμενου PRDII στοιχείου του υποκινητή, σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες κατά την TLR4- ή IL-1R1-επαγόμενη μεταγωγή σήματος. Η εγκυρότητα των παρατηρήσεών μας ενδυναμώνει από το γεγονός ότι παρόμοια αποτελέσματα αποκτήθηκαν από πειράματα διενεργηθέντα σε δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές με μειωμένα επίπεδα GRX1 (HeLa και HEK293).

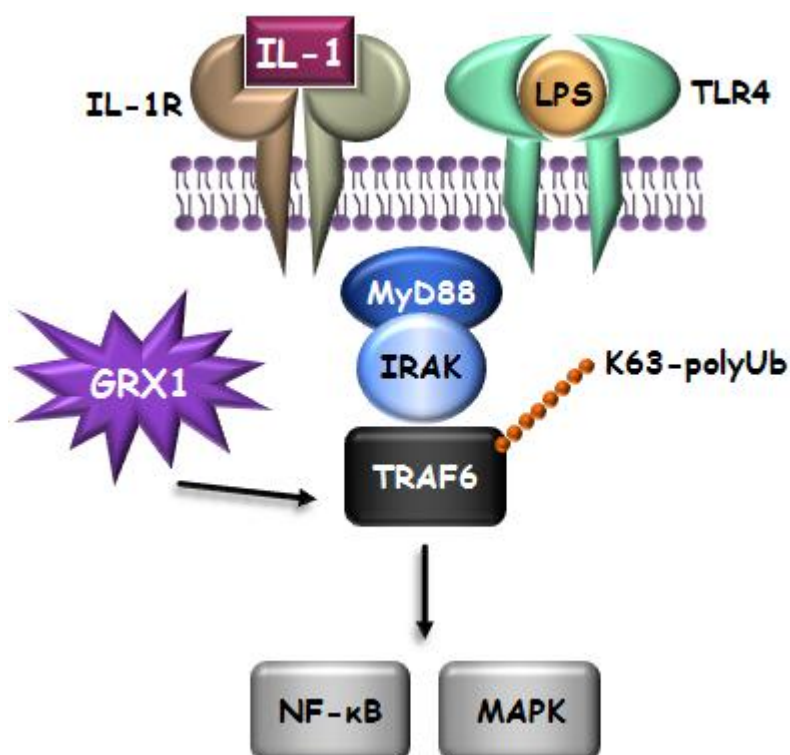
Η S-γλουταθειονυλίωση θεωρείται ότι συμβαίνει αυθόρμητα στις κυστεΐνες που εκτίθενται λόγω της στερεοδομής της πρωτεΐνης (Gallogly MM and Mielal JJ, 2007). Ο TRAF6 περιέχει ένα αμινοτερματικό μοτίβο RING δακτύλου πλούσιο σε κατάλοιπα κυστεΐνης και ιστιδίνης που θεωρείται απαραίτητο για τα καταρροϊκά σηματοδοτικά γεγονότα (Cao Z et al., 1996b; Rothe M et al., 1995; Takeuchi M et al., 1996). Τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης αποκάλυψαν ότι ο ανενεργός TRAF6 είναι S-γλουταθειονυλιωμένος και ότι η GRX1 είναι υπεύθυνη για την απογλουταθειονυλίωσή του μετά την ενεργοποίηση με IL-1. Αντίθετα, ο ανοσοκατακρημισμένος TRAF6 με ελαττωματικό μοτίβο RING δακτύλου δε γλουταθειονυλιώνεται υπό φυσιολογικές συνθήκες. Εάν και η θέση ή οι θέσεις της S-γλουταθειονυλίωσης του TRAF6 δεν είναι ακόμα γνωστές, τα ευρήματά μας αποκαλύπτουν ότι η παραπάνω τροποποίηση εξαρτάται από το μοτίβο RING δακτύλου του μορίου.

Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα, ο TRAF6 δρα ως E3 λιγάση ουβικιτίνης καταλύοντας την αυτό-πολυουβικιτίνωσή του (Deng L et al., 2000). Αυτή η K63 (λυσίνη 63)- πολυουβικιτίνωση προφανώς μεσολαβεί την προσέλκυση και ενεργοποίηση του συμπλόκου της TAK1, το οποίο με τη σειρά του φωσφορυλιώνει τον IKKβ, οδηγώντας στην ενεργοποίησή του και τελικά στην ενεργοποίηση του NF-κΒ (Wang C et al., 2001). Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης δείξαμε ότι τα μειωμένα επίπεδα της GRX1 εξασθενούν την αυτό-πολυουβικιτίνωση του TRAF6 μετά την ενεργοποίηση με τον IL-1R1, καθώς και την επακόλουθη ενεργοποίηση του NF-κΒ. Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου η S-γλουταθειονυλίωση επηρεάζει την πολυουβικιτίνωση του TRAF6 είναι ασαφής. Είναι πιθανόν η S-γλουταθειονυλίωση να επηρεάζει τη συνολική στερεοδομή του TRAF6 και να αναστέλλει την ενεργότητα E3 λιγάσης. Εναλλακτικά, ενδεχομένως η γλουταθειονυλίωση να επηρεάζει την αλληλεπίδραση του TRAF6 με τις Ubc13/UEV1A ή άλλες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την αυτό-πολυουβικιτίνωση του TRAF6. Σε κάθε περίπτωση, η απογλουταθειονυλίωση του TRAF6 από την GRX1 είναι προαπαιτούμενο για την πολύ-ουβικιτίνωση του μορίου. Επιπλέον, το φαινόμενο είναι ειδικό για τον TRAF6, αφού ο γενικός μηχανισμός ουβικιτίνωσης του κυττάρου δεν επηρεάζεται από τη μείωση της GRX1, όπως φαίνεται από την επιτυχή ουβικιτίνωση του υπερεκφρασμένου TRAF2 στα TGi14.

Η S-γλουταθειονυλίωση έχει αναδειχθεί σε μετα-μεταφραστική τροποποίηση που χρησιμεύει ως εν δυνάμει «σηματοδοτικός διακόπτης», ο οποίος ελέγχεται από την GRX1 (Bandyopadhyay S et al., 1998; Klatt P et al., 1999; Pineda-Molina E et al., 2001; Qanungo S et al., 2007; Reynaert NL et al., 2006; Xie Y et al., 2009). Είναι αξιοσημείωτο ότι ο «διακόπτης» αυτός χρησιμοποιείται εκτεταμένα σε φλεγμονώδη και αντι-ιικά μονοπάτια απόκρισης (Shelton MD and Mielal JJ, 2008). Η κινάση-1 που ρυθμίζει το σινιάλο της απόπτωσης (Apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1) είναι μία MAP3K που απαιτείται για την ενδογενή ανοσιακή απόκριση. Η ASK1 ενεργοποιείται από ποικίλα στρες συμπεριλαμβανομένου του οξειδωτικού, καθώς και φλεγμονωδών σινιάλων

που μεσολαβούνται από τον υποδοχέα, όπως των TNF και LPS (Matsuzawa A et al., 2005). Το τελευταίο εκκινεί τη ROS-επαγόμενη σύνδεση μεταξύ ASK1 και TRAF6 που είναι απαραίτητη για την επακόλουθη ενεργοποίηση της ASK1 (Takeda K et al., 2008). Κατά τους Song και συνεργάτες (Song JJ et al., 2002), η GRX1 δένει στο C-τελικό άκρο της ASK1 καταστέλλοντας την ενεργοποίησή της. Συνεπώς, θα αποτελούσε πρόκληση να διερευνηθεί εάν κατά την ενεργοποίηση με LPS σχηματίζεται ένα σύμπλοκο μεταξύ TRAF6-ASK1-GRX1, όπου και λαμβάνει χώρα η απογλουταθειονυλίωση του TRAF6. Ακόμα, ο TRAF6 μπορεί να συντονίζει το διαχωρισμό μεταξύ GRX1 και ASK1 που απαιτείται για την ενεργοποίηση της ASK1.

Ο TRAF6 αποτελεί μόριο-κλειδί για την προώθηση των φλεγμονωδών μονοπατιών που επάγονται από τους TLRs και την IL-1 και, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η ενεργοποίησή του βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του «διακόπτη» της S-γλουταθειονυλίωσης (**Εικόνα 54**). Φλεγμονώδεις ασθένειες, όπως η αρτηριοσκλήρυνση (Seong SY and Matzinger, 2004), καθώς και διάφορες κακοήθειες, όπως η μεταστατική ασθένεια των οστών (Jin W et al., 2008), φαίνεται να εξαρτώνται από τη σηματοδότηση που μεσολαβείται από τον TRAF6. Η GRX1 ως ουσιώδης ελεγκτής της ενεργοποίησης του TRAF6 μπορεί να αποδειχθεί σημαντικός στόχος για τη θεραπεία αυτών των ασθενειών.



Εικόνα 54. Η GRX1 εμπλέκεται στο μονοπάτι των IL-1R/TLR4.

#### 4.2.2 Η GRX1 εμπλέκεται στην ιική επαγωγή του γονιδίου της IFNβ

Στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε έναν πιθανό ρόλο της GRX1 στο μονοπάτι της IFNβ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, στα TG14 κύτταρα η *trans* ενεργοποίηση του υποκινητή της IFNβ μετά την επαγωγή με το Sendai virus είναι τουλάχιστον 50% λιγότερο αποτελεσματική σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Η μείωση αυτή είναι ειδική για τον υποκινητή της IFNβ, καθώς ο

υποκινητής της IL-8, ο οποίος επίσης περιέχει NF-κB- και AP1 θέσεις πρόσδεσης, αλλά μία C/EBP θέση αντί των IRF, είναι πλήρως ενεργός στα κύτταρα με ελαττωμένα επίπεδα GRX1. Αποδείχτηκε πρόσφατα από τους Reynaert και συνεργάτες (Reynaert NL et al., 2006) ότι η GRX1 ρυθμίζει την ενεργοποίηση της IKKβ μετά τη διέγερση με TNFα. Τα ευρήματά αυτά αποκάλυψαν ότι η IKKβ είναι S-γλουταθειονυλιωμένη και χρειάζεται να απογλουταθειονυλιωθεί από την GRX1 για να είναι πλήρως ενεργή καταλυτικά. Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε μία απώλεια 25% στην ενεργοποίηση του PRDII υποκινητή στα GRX1 KD κύτταρα, ενδεικτική μίας μικρής πτώσης στη δραστηριοποίηση του NF-κB, πιθανότατα λόγω της ανεπαρκούς ενεργοποίησης της IKKβ. Η παραπάνω εξασθένιση της ενεργοποίησης του NF-κB στα GRX1 KD κύτταρα αντανακλάται επίσης στη μικρή ελάττωση της ενεργοποίησης του IL-8 υποκινητή, που παρατηρείται στα ίδια κύτταρα. Το αξιοσημείωτο είναι ότι στα GRX1 KD κύτταρα μετά την επαγωγή με Iό ο υποκινητής PRDIII-I, που προσδένει IRFs, είναι 85% λιγότερο ενεργός σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Προφανώς, λοιπόν η πτώση του -110 υποκινητή στα συγκεκριμένα κύτταρα οφείλεται κύρια στους IRFs. Προκειμένου να αναδείξουμε τη γενική ισχύ της παρατήρησής μας, επαναλάβουμε τα πειράματα αυτά με παρόμοια αποτελέσματα σε HeLa κυτταροσειρά σταθερά επιμολυσμένη με το RNAi της GRX1.

Τα πειράματα αποκατάστασης της GRX1 αποκάλυψαν ότι η ελαττωμένη ενεργοποίηση των IRFs συσχετίζεται ειδικά με τη μείωση των επιπέδων της GRX1 στα KD κύτταρα. Ένα ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί το ό,τι η υπερέκφραση της GRX1 σε συνδυασμό με την ιική μόλυνση στα κύτταρα-μάρτυρες οδηγεί σε υπέρ-ενεργοποίηση του PRDIII-I υποκινητή κατά έναν συνεργιστικό τρόπο, υποδεικνύοντας ότι η GRX1 ενδέχεται να αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την ενεργοποίηση του IRF. Ωστόσο, η ιική μόλυνση δεν είχε επίδραση στη γονιδιακή έκφραση της GRX1. Επιπλέον, πειράματα PCR πραγματικού χρόνου για τη γονιδιακή έκφραση της IFNβ αποκάλυψαν ότι η υποέκφραση της GRX1 οδηγεί σε δραματική μείωση της μεταγραφής της IFNβ κατά την ιική μόλυνση. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η GRX1 είναι ουσιώδης ρυθμιστής του μονοπατιού της IFNβ.

Έχει, προηγουμένα, αναφερθεί ότι ο Sendai virus επάγει την ενεργοποίηση του IRF3 (Hiscott J et al., 1999; Lin R et al., 1998; Yoneyama M et al., 1998) και η οποία είναι ανεξάρτητη τόσο από την παραγωγή της ιντερφερόνης όσο και από τον πολλαπλασιασμό του ιού (Collins SE et al., 2004). Επιπλέον, ο IRF3, σε αντίθεση με τους IRF1, IRF7 και IRF9, ήταν απαραίτητος για την αρχική απόκριση στην είσοδο του ιικού σωματίου (Collins SE et al., 2004). Για αυτόν το λόγο διερευνήσαμε την πιθανότητα η GRX1 να ρυθμίζει το μονοπάτι ενεργοποίησης του IRF3. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης αποκάλυψαν ότι ο IRF3 είναι S-γλουταθειονυλιωμένος υπό φυσιολογικές συνθήκες και ότι η GRX1 είναι υπεύθυνη για την απογλουταθειονυλίωσή του κατά την ιική μόλυνση.

Επιπρόσθετα, μία δοκιμή πρόσδεσης του IRF3 στο DNA έδειξε ότι ο ενεργοποιημένος παράγοντας προσδένει στο DNA στην απογλουταθειονυλιωμένη μορφή. Κατά την ιική επαγωγή, ο IRF3 φωσφορυλιώνεται στο C-άκρο, διμερίζεται και μεταβαίνει στον πυρήνα για να προωθήσει τη μεταγραφή από συγκεκριμένους υποκινητές που φέρουν αλληλουχίες πρόσδεσης ISRE. Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι ο σχηματισμός των ομοδιμερών του IRF3, απαραίτητη προϋπόθεση για την πορεία ενεργοποίησης του παράγοντα, δεν επηρεάζεται στα GRX1 KD κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι η απογλουταθειονυλίωση του IRF3 δε χρειάζεται για τη φωσφορυλίωση και το διμερισμό του παράγοντα στο κυτταρόπλασμα. Ακόμα, η πυρηνική μεταβίβαση των GFP-IRF3

κατασκευών κατά την ιική μόλυνση δεν επηρεάζεται από τη μείωση των επιπέδων της GRX1. Χρησιμοποιήσαμε, λοιπόν, την IRF3-GAL4 κατασκευή για να καθορίσουμε την *trans* ενεργοποίηση από τον IRF3 κατά την επαγωγή με ιό στα κύτταρα-μάρτυρες και στα GRX-1 KD. Η υποέκφραση της GRX1 μείωσε σημαντικά την ενεργοποίηση του GAL4-luc, υποδεικνύοντας ότι η GRX1 ρυθμίζει την *trans* ενεργοποίηση από τον IRF3 και ότι η απογλουταθειουλίωση απαιτείται για την ικανότητα αυτή. Οι CBP/p300 είναι σημαντικοί συν-ενεργοποιητές για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες και βρίσκονται *in vivo* σε μάλλον περιοριστικές ποσότητες (Tanaka Y et al., 1997). Ο IRF3 αλληλεπιδρά με τους CBP/p300 συν-ενεργοποιητές για να ξεκινήσει τη μεταγραφή (Yoneyama M et al., 1998). Η αρχική μας υπόθεση ήταν ότι η απογλουταθειουλίωση του IRF3 ενδεχομένως να απαιτείται για την αποτελεσματική αλληλεπίδραση με το CBP. Η υπερέκφραση του CBP στα κύτταρα αύξησε τη μεταγραφική ενεργότητα του IRF3, αλλά δεν κατάφερε να αποκαταστήσει την απώλεια αυτής στα GRX1 KD κύτταρα, υποδεικνύοντας ότι ο S-γλουταθειουλιωμένος IRF3 δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με το CBP. Η ανοσοκατακρήμνιση του CBP από πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων-μάρτυρα και GRX1 KD έδειξε σημαντικά μειωμένη ποσότητα συγκατακρημιζόμενου IRF3 στα τελευταία μετά την επαγωγή με ιό. Συνεπώς, η απογλουταθειουλίωση του IRF3 χρειάζεται για την αποτελεσματική αλληλεπίδραση μεταξύ του CBP και του ενεργοποιημένου παράγοντα. Η σημασία της απογλουταθειουλίωσης του IRF3 για την αλληλεπίδρασή του με το CBP φαίνεται, επίσης, από την αυξημένη ποσότητα IRF3 που συγκατακρημιζείται με το CBP σε ιικά ενεργοποιημένα πυρηνικά εκχυλίσματα από GRX1 KD κύτταρα επωασμένα με hGRX1. Ακόμα, χορήγηση DTT σε ιικά μολυσμένα πυρηνικά εκχυλίσματα οδήγησε σε εξάλειψη της συγκατακρήμνισης CBP-IRF3, δείχνοντας την ανάγκη των θειολικών δεσμών για αυτή την αλληλεπίδραση. Κυστεΐνες που συμμετέχουν σε δεσμούς θειολών είναι ουσιώδεις για τη λειτουργία του IRF3 (Qin BY et al., 2003) και κάποιες από αυτές μπορεί να τις προστατεύει η S-γλουταθειουλίωση από μη-αναστρέψιμη οξειδωση, ενώ ο παράγοντας παραμένει ανενεργός στο κυτταρόπλασμα. Η επαγωγή με το Sendai virus καταλήγει στην απογλουταθειουλίωση αυτών των κυστεΐνων μέσω της GRX1, οπότε ο ενεργοποιημένος IRF3 μπορεί να σχηματίσει του απαραίτητους δεσμούς θειολών για την αλληλεπίδραση με το CBP.

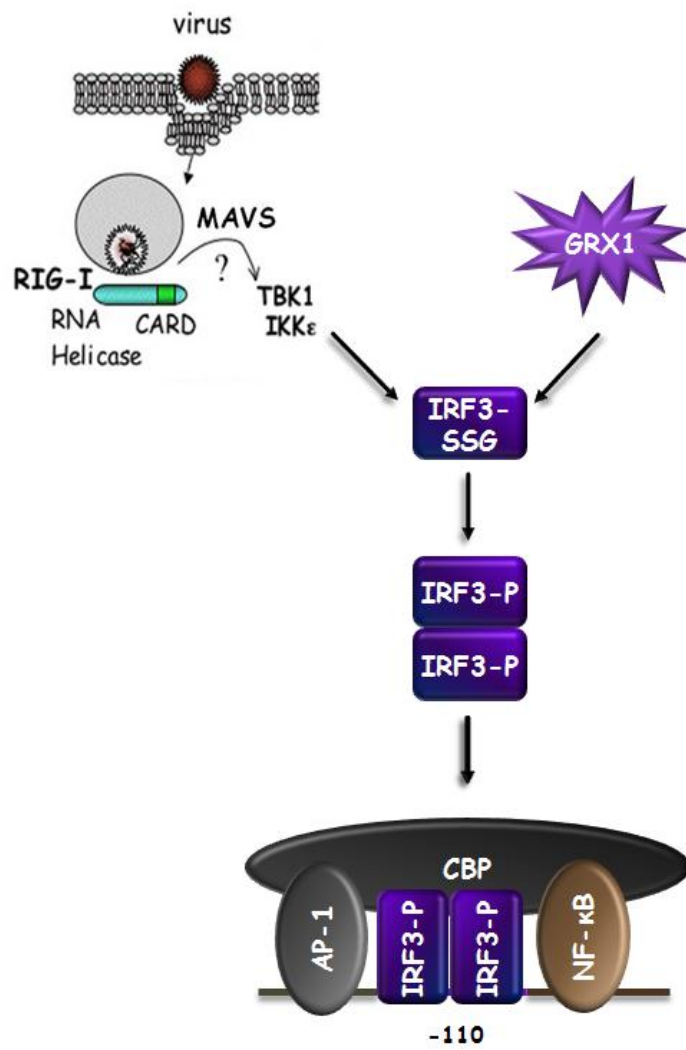
Ο ρόλος των κυστεΐνων στην ικανότητα *trans* ενεργοποίησης της μεταγραφής από τον IRF3 διερευνήθηκε με πειράματα επιμόλυνσης χρησιμοποιώντας μεταλλαγμένες μορφές του IRF3 που φέρουν αντικαταστάσεις κυστεΐνης με σερίνη. Κατασκευάσαμε 6 σημειακές μεταλλάξεις, μία για κάθε κυστεΐνη του μορίου του IRF3 (C167S, C222S, C267S, C289S, C347S και C371S) και αναλύσαμε τα επίπεδα γλουταθειουλίωσης αυτών των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης από επιμολυσμένα TV7 κύτταρα. Όλες οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες ήταν S-γλουταθειουλιωμένες, άρα πρέπει να υπάρχουν περισσότερες από μία γλουταθειουλιωμένες κυστεΐνες στο μόριο. Επίσης, ελέγξαμε την ικανότητά τους για *trans* ενεργοποίηση της μεταγραφής με πειράματα επιμόλυνσης σε TV7 και TGi14 κύτταρα. Στα TV7, οι πρωτεΐνες με τις μεταλλάξεις C164S και C267S έχουν παρόμοια ικανότητα ετερόπλευρης ενεργοποίησης της μεταγραφής με τον αγρίου-τύπου IRF3. Η μεταλλαγή της κυστεΐνης 222 ή 347 οδηγεί σε 25 και 30% μειωμένη ενεργοποίηση αντίστοιχα. Η μεταλλαγή των κυστεϊνών 289 ή 371 προκαλεί 50% απώλεια της ικανότητας ετερόπλευρης ενεργοποίησης του μορίου. Επομένως, περισσότερες της μίας κυστεΐνης εμπλέκονται στην ικανότητα του IRF3 για ετερόπλευρη ενεργοποίηση της μεταγραφής, πιθανότατα μέσω ενός δικτύου δεσμών θειολών. Οπότε, αυτοί οι δεσμοί θειολών δεν μπορούν να σχηματιστούν όταν η μία ή και οι δύο συμμετέχουσες κυστεΐνες

είναι γλουταθειονυλιωμένες. Η μεταλλαγή αυτών των κυστεϊνών θα μπορούσε να επηρεάσει όχι μόνο την κατάσταση γλουταθειονυλίωσής τους, αλλά και την ικανότητά τους να συμμετέχουν σε δισουλφίδια. Η εξάλειψη, λοιπόν, μίας συγκεκριμένης κυστεϊνης δε θα οδηγούσε απαραίτητα σε υπερ-ενεργοποίηση του IRF3, αλλά θα μπορούσε να μειώσει την ικανότητά του για *trans* ενεργοποίηση της μεταγραφής. Πράγματι, βρήκαμε ότι κάποιες από τις παραπάνω μεταλλαγές ελαττώνουν αυτή την ικανότητα του IRF3. Για να προσδιορίσουμε τις κυστεϊνες που γλουταθειονυλιώνονται, ανοσοκατακρημνίσαμε τον IRF3 και πραγματοποιήσαμε ανάλυση με φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS). Παρά τις έντονες προσπάθειές μας, οι κλασικές μέθοδοι MS απέτυχαν να ταυτοποιήσουν τον IRF3, πιθανότητα λόγω έλλειψης ιονισμού του μορίου. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι μέχρι στιγμής δεν έχει επιτευχθεί ταυτοποίηση του IRF3 μέσω MS.

Η GRX1 είναι συνεχώς ενεργή και ικανή να καταλύει την απογλουταθειονυλίωση S-γλουταθειονυλιωμένων πρωτεϊνών, όταν οι τροποποιημένες κυστεϊνες μπορούν να προσεγγιστούν από το ένζυμο (Fernandes AP and Holmgren A, 2004; Ghezzi P, 2005). Η φωσφορυλίωση του IRF3, που οδηγεί σε έκθεση της περιοχής ενεργοποίησης της μεταγραφής, μπορεί να αποτελεί επίσης το κρίσιμο γεγονός που χρειάζεται για να πλησιάσει η GRX1 και να απογλουταθειονυλιώσει τον παράγοντα. Ο Sendai virus δεν επάγει την έκφραση της GRX1 και για αυτό πιστεύουμε ότι καθιστά τον IRF3 διαθέσιμο για υπόστρωμα της GRX1. Ο ανενεργός IRF3 κινείται συνεχώς από και προς τον πυρήνα, με το σινιάλο εξόδου του να είναι πιο ενεργό από το σινιάλο εισόδου στον πυρήνα, ευνοώντας την παρουσία του παράγοντα στο κυτταρόπλασμα (Reich NC, 2002). Δείξαμε ότι η S-γλουταθειονυλίωση του IRF3 αναστέλλει την ικανότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής, οπότε η τροποποίηση μπορεί να λειτουργεί σαν μία επιπλέον «δικλείδα ασφαλείας» αποτρέποντας κάποια μη-αναγκαία ή τυχαία ενεργοποίηση του IRF3 και επομένως της IFN $\beta$ . Εν κατακλείδι, τα ευρήματά μας επιδεικνύουν έναν καινούριο ρυθμιστικό ρόλο της GRX1 στο μονοπάτι της IFN $\beta$  (**Εικόνα 55**).

Ο TRAF6 αποτελεί και αυτός ένα μόριο-κλειδί στην παραγωγή των IFN $\alpha/\beta$  ως απόκριση στην ιική προσβολή. Εάν και ο ακριβής του ρόλος στο μονοπάτι που επάγεται από τις RLHs δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος (Konno H et al., 2009; Yoshida R et al., 2008), είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση των IRF7 και NF- $\kappa$ B κατά τη διέγερση των TLR7, 8, 9 (Kawai T and Akira S, 2007b). Η GRX1, λοιπόν, θα μπορούσε να ελέγχει το μονοπάτι της IFN $\beta$  που επάγεται ιικά, επιδρώντας τόσο στην ενεργοποίηση του IRF3 όσο και του TRAF6.





Εικόνα 55. Η GRX1 εμπλέκεται στην κή επαγωγή του γονιδίου της IFNβ.



**συμπεράσματα**



- ✓ Η υπερέκφραση της TRX1 ενισχύει την GSNO-επαγόμενη συσσώρευση της HIF-1α και την ικανότητα του HIF-1 να προωθεί τη μεταγραφή.
- ✓ Η υπερέκφραση της TRX2 ή της TRXR2 ελαττώνει την GSNO-επαγόμενη συσσώρευση της HIF-1α και την ικανότητα του HIF-1 να προωθεί τη μεταγραφή.
- ✓ Οι TRX1, TRX2 και TRXR2 επηρεάζουν τη συσσώρευση της HIF-1α μέσω ρύθμισης της μετάφρασης που εξαρτάται από το κάλυμμα (cap-dependent translation). Στο μονοπάτι αυτό εμπλέκονται και οι p42/44 MAPK και η p70S6K κινάση.
- ✓ Τα επίπεδα ATP είναι αυξημένα στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την TRX1 σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες, ενώ είναι μειωμένα σε εκείνα που υπερεκφράζουν TRX2 ή TRXR2. Μείωση του ATP στα TRX1-υπερεκφράζοντα κύτταρα οδηγεί σε μείωση της GSNO-επαγόμενης συσσώρευσης της HIF-1α. Ίσως, οι TRXs να επηρεάζουν τη μετάφραση της HIF-1α ρυθμίζοντας το ATP.
- ✓ Τα TRX2-υπερεκφράζοντα κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα από τα κύτταρα-μάρτυρες στην αναστολή της ATP-συνθετάσης. Ενδεχομένως, λοιπόν, η υπερέκφραση της TRX2 να ρυθμίζει την ενεργότητα της ATP-συνθετάσης.
- ✓ Ο ανενεργός TRAF6 με ακέραιο RING μοτίβο είναι γλουταθειονυλιωμένος.
- ✓ Κατά την ενεργοποίηση με IL-1, η GRX1 καταλύει την απογλουταθειονυλίωση του TRAF6.
- ✓ Η απογλουταθειονυλίωση του TRAF6 είναι απαραίτητη για την αυτό-πολυουβικιτίνωσή του και τη μετέπειτα ενεργοποίηση του NF-κB.
- ✓ Η GRX1 είναι απαραίτητη για την ικκή ενεργοποίηση του IRF3 και τη μετέπειτα επαγωγή της IFNβ.
- ✓ Ο ανενεργός IRF3 είναι S-γλουταθειονυλιωμένος και η GRX1 είναι απαραίτητη για την απογλουταθειονυλίωσή του μετά την ικκή προσβολή.
- ✓ Η GRX1 είναι απαραίτητη για την ικανότητα του IRF3 να προωθεί τη μεταγραφή. Συγκεκριμένα, η GRX1 είναι αναγκαία για την αποτελεσματική αλληλεπίδραση μεταξύ IRF3 και CBP.



περιλήψεις





## 6.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΘΕΜΕΛΙΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Οι μηχανισμοί που εξαρτώνται από την οξειδοαναγωγή επηρεάζουν τη λειτουργικότητα πολλών πρωτεϊνών και συμμετέχουν στη ρύθμιση των πλέον ουσιωδών ζωτικών διαδικασιών του κυττάρου, όπως στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές έχουν εστιάσει την προσοχή τους στη ρύθμιση θειόλης-δισουλφιδίου, η οποία πραγματοποιείται από τις οξειδοαναγωγικές πρωτεΐνες, των οποίων οι ενεργότητες εξαρτώνται από ένα οξειδοαναγωγικό ενεργό κέντρο με τη μορφή μίας αμινοξικής ακολουθίας με μία ή δύο ενεργές θειόλες. Μεταξύ αυτών ξεχωρίζουν δύο αναγωγάσες θειόλης-δισουλφιδίου: η θειορεδοξίνη (TRX) και η γλουταρεδοξίνη (GRX). Τα ένζυμα αυτά έχουν πολλές λειτουργίες και συνιστούν συστήματα που εξαρτώνται από τη θειορεδοξίνη και τη γλουταρεδοξίνη διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης.

Το πρώτο σύστημα περιέχει εκτός από την TRX, μία NADPH-εξαρτώμενη αναγωγή της θειορεδοξίνης (TRXR), η οποία ανάγει την οξειδωμένη μορφή της TRX. Στα ευκαρυωτικά έχουν εντοπιστεί δύο κύριες ισομορφές της TRX, η TRX1, που είναι κυρίως κυτταροπλασματική και ανάγεται από την TRXR1 και η μιτοχονδριακή TRX2, που ανάγεται από την TRXR2. Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνηθεί εάν οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του παράγοντα-1 που επάγεται από την υποξία (HIF-1) από το μονοξείδιο του αζώτου (NO).

Ο HIF-1 αποτελείται από δύο υπομονάδες, τις HIF-1α και HIF-1β και συνιστά πρωταγωνιστικό ρυθμιστή για την προσαρμογή σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, δηλαδή στην υποξία. Σε αντίθεση με τη συνεχώς εκφραζόμενη HIF-1β, η HIF-1α ρυθμίζεται από την υποξία, αλλά μπορεί να επαχθεί και υπό φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου (21% O<sub>2</sub>) από διάφορα ερεθίσματα, όπως είναι το NO. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε την S-nitrosoglutathione (GSNO), που θεωρείται ένας από τους πιο φυσιολογικούς δότες NO. Ο συγκεκριμένος δότης NO οδηγεί σε συσσώρευση της HIF-1α, αφού στην ουσία μειώνει την ουβικιτινωσή της και, συνεπώς, την αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα.

Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση της TRX2 ή της TRXR2 σε HEK293 κύτταρα εμποδίζει τη NO-επαγόμενη συσσώρευση της HIF-1α, καθώς και την ικανότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής του HIF-1. Αντίθετα, η TRX1 ενισχύει την ποσότητα της HIF-1α πρωτεΐνης και τη δράση του HIF-1 μετά τη χορήγηση NO. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι θειορεδοξίνες επηρεάζουν τη μετάφραση της HIF-1α που εξαρτάται από το κάλυμμα (cap-dependent translation), δείξαμε ότι στο μονοπάτι αυτό εμπλέκεται η p42/44 πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα (MAPK) και η p70S6 κινάση. Τέλος, το ενδοκυττάριο ATP αυξάνεται στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την TRX1, ενώ μειώνεται σε εκείνα που υπερεκφράζουν την TRX2 ή την TRXR2, παρέχοντας μία επιπλέον ένδειξη για το πώς η πρωτεϊνοσύνθεση επηρεάζεται από τις θειορεδοξίνες.

Το δεύτερο από τα οξειδοαναγωγικά συστήματα που αναφέρθηκαν στην αρχή, εκείνο της GRX, περιλαμβάνει ακόμα τη γλουταθειόνη (GSH), η οποία ανάγει την οξειδωμένη GRX και τη NADPH-εξαρτώμενη αναγωγή της γλουταθειόνης, που ανάγει με τη σειρά της την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Ένα σημαντικό ποσοστό της γλουταθειόνης μπορεί να προσδεθεί αντιστρεπτά στη σουλφυδρυλική ομάδα (-SH) κάποιων πρωτεϊνικών καταλοίπων κυστεΐνης (PSH)

μέσω ενός μηχανισμού που καλείται S-γλουταθειονυλίωση και ο οποίος οδηγεί σε S-γλουταθειονυλιωμένες πρωτεΐνες (PSSGs). Η αναγωγή αυτών των μικτών δισουλφιδίων (δηλαδή η διαδικασία της απογλουταθειονυλίωσης) καταλύεται από την GRX. Παράλληλα, οι GRXs μπορούν να ανάγουν ενδο- ή δια-μοριακούς πρωτεϊνικούς δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως και οι TRXs.

Η S-γλουταθειονυλίωση αποτελεί μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση που αναδεικνύεται σε οξειδοαναγωγικό ρυθμιστικό μηχανισμό της πρωτεϊνικής ενεργότητας και των σχετιζόμενων κυτταρικών λειτουργιών. Πολλές διαφορετικές κυτταρικές πρωτεΐνες, όπως μεταγραφικοί παράγοντες, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, ένζυμα και κυτοκίνες, έχουν βρεθεί να είναι γλουταθειονυλιωμένες, εάν και η βιολογική σημασία της τροποποίησής τους δεν έχει αποσαφηνιστεί. Η αναστρεψιμότητα της γλουταθειονυλίωσης αποτελεί βασικό κριτήριο για να θεωρηθεί ρυθμιστικός μηχανισμός.

Στην παρούσα εργασία διερευνήσαμε το ρόλο της κυτταροπλασματικής GRX1 σε μονοπάτια ενδογενούς ανοσίας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε HEK293 και HeLa κυτταροσειρές που υποεκφράζουν την GRX1. Το πρώτο μονοπάτι με το οποίο ασχοληθήκαμε είναι αυτό που κινητοποιείται από τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 (IL-1R) ή από τον υποδοχέα4 που μοιάζει με τον Toll (TLR4). Πρωταγωνιστικό ρόλο στον παραπάνω σηματοδοτικό καταρράκτη κατέχει ο παράγοντας6 που σχετίζεται με τον υποδοχέα του TNF (TRAF6). Το μόριο αυτό έχει ένα RING μοτίβο με ενεργότητα E3 λιγάσης της ουβικιτίνης. Κατά την ενεργοποίησή του, λυπόει σε K63-συνδεόμενη αυτό-πολυουβικιτίνωση, η οποία στην ουσία είναι απαραίτητη για την καταρροϊκή μεταγωγή του σήματος και πιο συγκεκριμένα για την ενεργοποίηση του NF-κB. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ο ανενεργός TRAF6 με ακέραιο RING μοτίβο είναι S-γλουταθειονυλιωμένος και ότι μετά την ενεργοποίηση με IL-1 καταλύεται η απογλουταθειονυλίωσή του από την GRX1. Επίσης, το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για την αυτό-πολυουβικιτίνωσή του και την επακόλουθη ενεργοποίηση του NF-κB.

Το δεύτερο μονοπάτι ενδογενούς ανοσίας στο οποίο διερευνήσαμε το ρόλο της GRX1 είναι αυτό της επαγωγής της ιντερφερόνηςβ (IFNβ) από το Sendai virus. Ο τρίτος ρυθμιστικός παράγοντας της ιντερφερόνης (IRF3) αποτελεί έναν σημαντικό μεταγραφικό ρυθμιστή των γονιδίων της ιντερφερόνης. Ο ανενεργός IRF3 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, μετά τη μόλυνση με Sendai virus, φωσφορυλιώνεται, ομοδιμερίζει, μεταβαίνει στον πυρήνα, προσδέεται σε γονίδια στόχους και ενεργοποιεί τη μεταγραφή αλληλεπιδρώντας με τους συν-ενεργοποιητές CBP/p300. Η μελέτη μας έδειξε ότι ο ανενεργός IRF3 είναι S-γλουταθειονυλιωμένος. Κατά την ιική μόλυνση απογλουταθειονυλιώνεται από την GRX1. Ελλείπει GRX1, ο ιός επάγει τη φωσφορυλίωση, τον ομοδιμερισμό και τη μετάβαση του IRF3 στον πυρήνα. Ωστόσο, εμποδίζεται η αλληλεπίδραση του IRF3 με το CBP και άρα η έκφραση της IFNβ.

Εν κατακλείδι, αυτές οι μελέτες αποκαλύπτουν ότι ο «διακόπτης» της S-γλουταθειονυλίωσης και η GRX1 εμπλέκονται εκτεταμένα σε μονοπάτια φυσικής ανοσίας.

## 6.2 THE ROLE OF THIOREDOXIN SUPERFAMILY ON THE REGULATION OF FUNDAMENTAL CELLULAR PROCESSES

### Eleni Chantzoura

Redox-dependent mechanisms influence the functional activity of many proteins and participate in the regulation of vital cellular processes such as proliferation, differentiation, and apoptosis. Researchers have recently focused on thiol–disulfide regulation, which is carried out by redox proteins, whose activities depend on an active site containing one or two active thiols. Among these proteins, two thiol–disulfide reductases stand out: thioredoxin (TRX) and glutaredoxin (GRX), which are members of the thioredoxin superfamily. These enzymes are multifunctional and comprise thioredoxin- and glutaredoxin-dependent systems playing an important role in maintenance of intracellular redox homeostasis.

The first system contains, apart from TRX, a NADPH-dependent thioredoxin reductase (TRXR), which reduces the oxidised form of thioredoxin. The major TRX isoforms in eukaryotes are the mainly cytosolic TRX1 which is reduced by TRXR1 and the mitochondrial TRX2 which is reduced by TRXR2. We wanted to investigate whether the above proteins are implicated in the NO-induced activation of the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1).

HIF-1 consists of two subunits, HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$  and it is a key regulator for adaptation to low oxygen availability, i.e., hypoxia. In contrast to the constitutively expressed HIF-1 $\beta$ , HIF-1 $\alpha$  is regulated by hypoxia, but also under normoxia (21% O<sub>2</sub>) by several stimuli, including nitric oxide (NO). In this study, we used S- nitrosoglutathione (GSNO, considered the most physiological NO donor), which results in HIF-1 $\alpha$  protein accumulation due to decreased ubiquitination and proteasomal degradation.

We present evidence that overexpression of TRX2 or TRXR2 attenuates NO-evoked HIF-1 $\alpha$  accumulation and transactivation of HIF-1 in HEK293 cells. In contrast, cytosolic-located TRX1 enhances HIF-1 $\alpha$  protein amount and activity under NO treatments. Furthermore, taking into consideration that TRXs affect HIF-1 $\alpha$  cap-dependent translation, we show that p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and p70S6 kinase are involved in the above pathway. Finally, the intracellular ATP was increased in TRX1-overexpressing cells but reduced in cells overexpressing TRX2 or TRXR2, providing thus an understanding of how protein synthesis is regulated by thioredoxins.

The second redox system mentioned above includes GRX, glutathione (GSH) as an agent reducing the oxidised GRX and NADPH-dependent glutathione reductase reducing glutathione from its oxidised form (GSSG).

A notable amount of GSH can be reversibly bound to the –SH of protein cysteinyl residues (PSH) by a mechanism called S-glutathionylation, which generates S-glutathionylated proteins (PSSGs). The reduction of the above mixed disulfides (i.e., the deglutathionylation process) is catalysed by GRX. Also, GRXs, like TRXs, can reduce intra- or inter-molecular protein disulfide bonds.

S-glutathionylation is a post-translational modification that has emerged as a potential redox regulatory mechanism of protein activity and associated cellular functions. Many diverse cellular proteins such as transcription factors, adhesion molecules, enzymes, and cytokines are reported to undergo glutathionylation, although the functional impact has been less well characterised.

Reversibility of glutathionylation is critical in determining the physiological relevance of glutathionylation as a means of protein regulation.

In the present study, we tried to shed light on the role of cytoplasmic GRX1 on certain pathways of innate immunity. For this scope, we used HEK293 and HeLa cell lines stably underexpressing GRX1. The first pathway we dealt with is the one triggered by Interleukin-1 receptor (IL-1R) or Toll-like receptor4 (TLR4). TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) is a critical intermediate signaling molecule involved in the above cascade. The particular protein has a RING-finger motif with an E3 ubiquitin ligase activity. Upon its activation, TRAF6 undergoes K63-linked auto-polyubiquitination which mediates signal propagation and is, specifically, required for the subsequent NF- $\kappa$ B activation. We found that TRAF6 with an intact RING-finger motif is S-glutathionylated under normal conditions. Moreover, upon IL-1 stimulation TRAF6 undergoes deglutathionylation catalysed by GRX1. The deglutathionylation of TRAF6 is essential for its auto-polyubiquitination and subsequent activation.

We also investigated the role of GRX1 on the induction of interferon  $\beta$  (IFN $\beta$ ) by Sendai virus. Interferon regulatory factor 3 (IRF3) is an essential transcriptional regulator of the interferon genes. IRF3 is constitutively present in a latent conformation in the cell cytoplasm. In cells infected by Sendai virus, IRF3 becomes phosphorylated, homodimerises, translocates to the nucleus, binds to target genes and activates transcription by interacting with CBP/p300 co-activators. In this study, we report that in non-infected cells IRF3 is post-translationally modified by S-glutathionylation. Upon viral-infection, it undergoes a deglutathionylation step that is controlled by GRX1. In virus-infected GRX-1 knockdown cells, phosphorylation, homodimerisation and nuclear translocation of IRF3 were not affected, but the transcriptional activity of IRF3 and the expression of IFN $\beta$ , were severely reduced. Actually, deglutathionylation of IRF3 is necessary for efficient interaction of IRF3 with CBP, an event essential for transcriptional activation of the interferon genes.

Notably, these studies reveal that the S-glutathionylation “switch” is extensively involved in inflammatory and anti-viral response pathways.

**συντμήσεις**



**2OG:** 2-Oxoglutarate (2-Οξογλουταρικό)

**AP:** activator protein (πρωτεΐνη-ενεργοποιητής)

**APC:** antigen-presenting cell (αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο)

**ARE:** AU rich element (στοιχείο πλούσιο σε AU)

**ARM domain:** Armadillo domain

**ARNT:** aryl hydrocarbon nuclear translocator (πυρηνικός μεταφορέας αρυλ-υδατανθρακών)

**ArsC:** arsenate reductase (αναγωγή αρσενικού)

**ASK:** apoptosis signal-regulating kinase (κινάση που ρυθμίζει τη σηματοδότηση της απόπτωσης)

**ATF:** activating transcription factor (μεταγραφικός παράγοντας-ενεργοποιητής)

**BCL:** B-cell lymphoma (λέμφωμα B-κυττάρων)

**BCL-xL:** B-cell lymphoma-extra large (λέμφωμα B-κυττάρων-πολύ μεγάλο)

**bHLH:** basic helix-loop-helix (βασική έλικα-θηλιά-έλικα)

**CARD:** caspase-recruiting domain (περιοχή προσέλκυσης κασπασών)

**CAT:** catalase (καταλάση)

**CBP:** CREB binding protein (πρωτεΐνη που δένει στην CREB)

**CFTR:** cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (διαμεμβρανικός ρυθμιστής αγωγιμότητας κυστικής ίνωσης)

**cGMP:** cyclic guanosine monophosphate (κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη)

**COPD:** chronic obstructive pulmonary disease (χρόνια αποφρακτική πνευμονική νόσος)

**CREB:** cyclic AMP-responsive element binding protein (πρωτεΐνη που προσδένει στο στοιχείο που αποκρίνεται στο κυκλικό AMP)

**DC:** dendritic cell (δενδριτικό κύτταρο)

**DD:** death domain (περιοχή θανάτου)

**DSB:** disulfide bond protein (πρωτεΐνη δισουλφιδικού δεσμού)

**ECEF:** eosinophil cytotoxicity-enhancing factor (παράγοντας ενίσχυσης της κυτταροτοξικότητας των ηωσινόφιλων)

**EGF:** epidermal growth factor (επιδερμικός αυξητικός παράγοντας)

**EPR:** electron paramagnetic resonance (ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός)

**ER:** Endoplasmic Reticulum (Ενδοπλασματικό Δίκτυο)

**ERK:** extracellular signal-regulated protein kinase (πρωτεϊνική κινάση που ρυθμίζεται από εξωκυττάρια σήματα)

**ET-1:** Endothelin-1 (Ενδοθηλίνη-1)

**FADD:** Fas-associated death domain-containing protein (Fas-σχετιζόμενη πρωτεΐνη με περιοχή θανάτου)

**FBS:** fetal bovine serum (ορός εμβρύου βοός)

**FIH-1:** factor-inhibiting HIF-1 (παράγοντας που αναστέλλει το HIF-1)

**FKBP:** FK506 binding protein (πρωτεΐνη που προσδένει στην FK506)

**GAPDH:** glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης)

**GAS:** gamma-activated sequence (γάμμα-ενεργοποιημένη αλληλουχία)

**GR:** glutathione reductase (αναγωγάση της γλουταθειόνης)

**GRR:** glycine-rich region (τμήμα πλούσιο σε γλυκίνη)

**GRX:** Glutaredoxin (Γλουταρεδοξίνη)

**GSH:** Glutathione (Γλουταθειόνη)

**GSHPx, GPx:** glutathione peroxidase (περοξειδάση γλουταθειόνης)

**GST:** glutathione S-transferase (S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης)

**HAT:** histone acetylase (ακετυλάση ιστονών)

**HDAC:** histone deacetylase (αποακετυλάση ιστονών)

**HIF-1:** hypoxia inducible factor-1 (παράγοντας-1 που επάγεται από την υποξία)

**HIV:** human immunodeficiency virus (ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας)

**HLH:** helix-loop-helix domain (περιοχή έλικας-θηλειάς-έλικας)



- HMG:** high-mobility group (ομάδα υψηλής κινητικότητας)
- HRE:** HIF-responsive element (στοιχείο που αποκρίνεται στο HIF)
- Hsp:** heat-shock protein (πρωτεΐνη θερμικού σοκ)
- IAM:** iodoacetamide (ιωδοακεταμίδιο)
- IFN:** interferon (ιντερφερόνη)
- Ig:** immunoglobulin (ανοσοσφαιρίνη)
- IGF:** insulin-like growth factor (αναπτυξιακός παράγοντας που μοιάζει με την ινσουλίνη)
- IKK:** IκB kinase (κινάση της IκB)
- IL:** interleukin (ιντερλευκίνη)
- IL-1R:** IL-1 Receptor (Υποδοχέας Ιντερλευκίνης)
- IL-1RA:** IL-1R antagonist (ανταγωνιστής του IL-1R)
- IL-1RAcP:** IL-1R accessory protein (βοηθητική πρωτεΐνη του IL-1R)
- IL-1RAPL:** IL-1R accessory protein-like (πρωτεΐνη που μοιάζει με τη βοηθητική πρωτεΐνη του IL-1R)
- IL-1Rrp:** IL-1R-related protein (συγγενική πρωτεΐνη του IL-1R)
- IPS:** IFN-beta promoter stimulator (ενεργοποιητής του υποκινητή της IFNβ)
- IRAK:** IL-1R-associated kinase (κινάση που σχετίζεται με τον IL-1R)
- IRF:** interferon regulatory factor (ρυθμιστικός παράγοντας της ιντερφερόνης)
- IRS:** insulin receptor substrate (υπόστρωμα του υποδοχέα της ινσουλίνης)
- ISG:** interferon stimulated gene (γονίδιο που ενεργοποιείται από την IFN)
- ISGF:** IFN-stimulated gene factor (γονιδιακός παράγοντας που ενεργοποιείται από την IFN)
- ISRE:** IFN-stimulated response element (στοιχείο απόκρισης στην ενεργοποίηση με IFN)
- IκB:** Inhibitor of κB (Αναστολέας της κB)
- JAK:** Janus kinase (Janus κινάση)
- JH:** JAK homology domain (επικράτεια ομολογίας των JAKs)

**JNK:** c-jun N-terminal kinase (c-jun N-τελική κινάση)

**LBP:** LPS-binding protein (πρωτεΐνη που προσδένει στο LPS)

**LPS:** lipopolysaccharides (λιποπολυσακχαρίτες)

**LRR:** leucine-rich repeat (επανάληψη πλούσια σε λευκίνη)

**LZ:** leucine zipper domain (περιοχή φερμουάρ λευκίνης)

**MAL:** MyD88-adaptor-like (όμοια με τον προσαρμοστή MyD88)

**MAPK:** mitogen signal-regulated protein kinase (πρωτεϊνική κινάση που ρυθμίζεται από μιτογόνα σήματα)

**MAVS:** mitochondrial antiviral-signaling protein (μιτοχονδριακή πρωτεΐνη αντι-ιικής σηματοδότησης)

**MDA:** melanoma differentiation-associated gene (γονίδιο που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση του μελανώματος)

**MEKK:** MAPK/ERK kinase kinase (κινάση της κινάσης της MAPK ή της ERK)

**MHC:** major histocompatibility complex (μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας)

**MIP:** macrophage inflammatory protein (φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων)

**MKK:** MAP kinase kinase (κινάση MAPK)

**MNK:** MAPK signal-integrating kinases (κινάσες που ενσωματώνουν το MAPK σινιάλο)

**MTS:** Mitochondrial Translocation Signal (Σήμα Εντοπισμού στα Μιτοχόνδρια)

**MyD:** myeloid differentiation protein (μυελοειδής πρωτεΐνη διαφοροποίησης)

**NBD:** NEMO-binding domain (περιοχή πρόσδεσης NEMO)

**NDP:** nucleoside diphosphate (διφωσφορικό νουκλεοσίδιο)

**NEMO:** NF-κB essential modulator (αναγκαίος τροποποιητής του NF-κB)

**NF-κB:** nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (πυρηνικός παράγοντας που ενισχύει την κάππα ελαφρά αλυσίδα των ενεργοποιημένων B κυττάρων)

**NK cell:** natural killer cell (κύτταρο φυσικός φονέας)

**NLR:** NOD-like receptor (υποδοχέας που μοιάζει με NOD)

- NLS:** nuclear localization signal (σινιάλο εντοπισμού στον πυρήνα)
- NOD:** nucleotide-binding oligomerization domain (περιοχή ολιγομερισμού που προσδένει νουκλεοτίδια)
- NOS:** nitric oxide synthase (συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου)
- NRD:** negative regulatory domain (αρνητική ρυθμιστική περιοχή)
- OAS:** 2'-5' oligo-Adenylate synthetase (2'-5' ολιγοαδενυλική συνθετάση)
- ODDD:** O<sub>2</sub>-dependent degradation domain (O<sub>2</sub>-εξαρτώμενη επικράτεια αποικοδόμησης)
- OMM:** outer membrane (εξωτερική μεμβράνη)
- PAMP:** pathogen-associated molecular pattern (μοριακό μοτίβο που σχετίζεται με το παθογόνο)
- PAPS:** 3'-phosphoadenylylsulfate (3-φωσφοαδενυλοθειικό)
- PCAF:** P300/CBP-associated factor (P300/CBP-συσχετιζόμενος παράγοντας)
- PDI:** protein disulfide isomerase (ισομεράση των πρωτεϊνικών δισουλφιδίων)
- PERK:** PKR-like ER kinase (κινάση του ενδοπλασματικού δικτύου που μοιάζει με την PKR)
- PHD:** prolyl hydroxylase domain protein (πρωτεΐνη με περιοχή προλυλ-υδροξυλασής)
- PI3K:** phosphatidylinositol-3-kinase (κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης-3)
- PKA:** cyclic AMP-dependent protein kinase (πρωτεϊνική κινάση που εξαρτάται από το κυκλικό AMP)
- PKC:** protein kinase C (πρωτεϊνική κινάση C)
- PKR:** dsRNA-dependent protein kinase (πρωτεϊνική κινάση που εξαρτάται από το δίκλωνο RNA)
- PRD:** positive regulatory domain (θετική ρυθμιστική περιοχή)
- PRR:** pattern-recognition receptor (υποδοχέας αναγνώρισης μοτίβου)
- PRX:** Peroxiredoxin (περοξυρεδοξίνη)
- PTB:** polyguanine tract-binding protein (πρωτεΐνη που δένει σε πολυπυριμιδίνη)
- PTEN:** phosphatase and tensin homolog (ομόλογο της φωσφατάσης και της τενσίνης)
- PTP:** protein tyrosine phosphatase (φωσφατάση πρωτεϊνικής τυροσίνης)

**QSOX:** quiescin-sulfhydryl oxidase (οξειδάση σουλφυδρυλίων πρωτεϊνών)

**RANK:** receptor activator of NF-κB (υποδοχέας-ενεργοποιητής του NF-κB)

**RANTES:** regulated on activation normal T-cell expressed and secreted (χημοκίνη που ρυθμίζεται κατά την ενεργοποίηση, εκφράζεται και εκκρίνεται από φυσιολογικά T-κύτταρα)

**REF:** redox factor (παράγοντας οξειδοαναγωγής)

**RHD:** Rel homology domain (περιοχή ομολογίας με τη Rel)

**RHIM:** RIP homotypic interaction motif (μοτίβο ομοτυπικής αλληλεπίδρασης με τη RIP)

**RIG:** retinoic acid inducible gene (γονίδιο που επάγεται από το ρετινοϊκό οξύ)

**RING:** really interesting new gene (πολύ ενδιαφέρον νέο γονίδιο)

**RIP:** ribosome-inactivating protein (πρωτεΐνη απενεργοποίησης του ριβοσώματος)

**RNR:** ribonucleotide reductase (ριβονουκλεοτιδική αναγωγή)

**RNS:** reactive nitrogen species (δραστικές μορφές αζώτου)

**ROS:** reactive oxygen species (δραστικές μορφές οξυγόνου)

**RSV:** respiratory syncytial virus (συγκυτιακός ιός του αναπνευστικού)

**SAM:** sterile alpha motif (στείρο άλφα μοτίβο)

**SAPK:** stress-activated protein kinase (στρες-ενεργοποιούμενη πρωτεϊνική κινάση)

**SARM:** sterile alpha motif (SAM) and Armadillo motif (ARM) domain-containing protein (πρωτεΐνη που περιέχει μοτίβα SAM και ARM)

**SCO:** synthesis of cytochrome c oxidase (σύνθεση της οξειδάσης του κυτοχρώματος c)

**Sec:** Selenocysteine (Σεληνοκυστεΐνη)

**SECIS:** Sec insertion sequence (ακολουθία εισαγωγής σεληνοκυστεΐνης)

**SERCA:** sarco/ endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (ATPάση Ca<sup>2+</sup> του σαρκο/ ενδοπλασματικού δικτύου)

**SIGIRR:** single immunoglobulin IL-1R related molecule (συγγενικό μόριο του IL-1R με μία περιοχή ανοσοσφαιρίνης)

**SNF:** sucrose non-fermenting (μη-ζύμωση σουκρόζης)

- SOD:** superoxide dismutase (δισμουτάση του υπεροξειδίου)
- SRX:** Sulfiredoxin (Σουλφιρεδοξίνη)
- STAT:** signal transducer and activator of transcription (μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής)
- SWI:** switch (διακόπτης)
- TAB:** TAK1-binding protein (πρωτεΐνη που προσδένει στην TAK1)
- TAD:** transactivation domain (περιοχή ετερόπλευρης ενεργοποίησης)
- TAK:** TGFβ-activated protein kinase (πρωτεϊνική κινάση του ενεργοποιημένου TGFβ)
- TANK:** TRAF family member-associated NF-κB activator (ενεργοποιητής του NF-κB που σχετίζεται με μέλη της TRAF οικογένειας)
- TBK:** TANK-binding protein (πρωτεΐνη που δένει στην TANK)
- TBP:** TRX-binding protein (πρωτεΐνη που προσδένει στην TRX)
- TCR:** T-cell receptor (υποδοχέας T-κυττάρου)
- TF:** transcription factor (μεταγραφικός παράγοντας)
- TGF:** tumour growth factor (παράγοντας ανάπτυξης όγκου)
- TGR:** thioredoxin glutathione reductase (αναγωγή θειορεδοξίνης-γλουταρεδοξίνης)
- Th:** T-helper (T-βοηθητικά)
- TICAM:** TIR-domain-containing molecule (μόριο που περιέχει περιοχή TIR)
- TIGIRR:** three immunoglobulin IL-1R-related (συγγενική πρωτεΐνη του IL-1R με τρεις περιοχές ανοσοσφαιρίνης)
- TIR domain:** Toll/IL-1R domain (περιοχή Toll/ υποδοχέα IL-1)
- TIRAP:** TIR-associated protein (πρωτεΐνη που σχετίζεται με το TIR)
- TLR:** Toll-like receptor (υποδοχέας που μοιάζει με τον Toll)
- TMX:** transmembrane thioredoxin-related (διαμεμβρανική πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη θειορεδοξίνη)
- TNF:** tumor necrosis factor (παράγοντας νέκρωσης όγκου)
- TNFR:** TNF receptor (υποδοχέας του TNF)

**TRAF:** TNFR-associated factor (TNFR-σχετιζόμενος παράγοντας)

**TRAM:** TRIF-related adaptor molecule (TRIF-σχετιζόμενο μόριο-προσαρμοστής)

**TRIF:** TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN $\beta$  (πρωτεΐνη-προσαρμοστής που περιέχει TIR και επάγει την IFN- $\beta$ )

**TRX:** thioredoxin (θειορεδοξίνη)

**TRXR:** thioredoxin reductase (αναγωγή της θειορεδοξίνης)

**TSC:** tuberous sclerosis complex (σύμπλοκο οζώδους σκλήρυνσης)

**Txl:** thioredoxin-like (πρωτεΐνη που μοιάζει με τη θειορεδοξίνη)

**Ubc:** ubiquitin-conjugating enzyme (ένζυμο σύζευξης ουβικιτίνης)

**Uev:** ubiquitin-conjugating enzyme E2 (E2 ένζυμο σύζευξης ουβικιτίνης)

**UTR:** untranslated region (μη-μεταφραζόμενη περιοχή)

**VDUP:** vitamin D3 upregulated protein (πρωτεΐνη που αυξάνεται από τη βιταμίνη D3)

**VEGF:** vascular endothelial growth factor (αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου)

**VHL:** von Hippel-Lindau protein (πρωτεΐνη von Hippel-Lindau)

**VISA:** virus-induced signaling adaptor (ιικά-επαγόμενος σηματοδοτικός προσαρμοστής)



# βιβλιογραφία





**Abe J and Berk BC.** (1999) Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *J Biol Chem*, **274**, 21003–21010.

**Adachi T, Pimentel DR, Heibeck T, Hou X, Lee YJ, Jiang B, Ido Y and Cohen RA.** (2004a) S-glutathiolation of Ras mediates redox-sensitive signaling by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **279**, 29857-29862.

**Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schoneich C and Cohen RA.** (2004b) S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med*, **10**, 1200-1207.

**Agelopoulos, M., Thanos, D.** (2006) Epigenetic determination of a cell specific gene expression program by ATF-2 and the histone variant macroH2A. *EMBO J*, **25**, 4843–4853.

**Akira S, Uematsu S and Takeuchi O.** (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**, 783-801.

**Akterin S, Cowburn RF, Miranda-Vizueté A, Jimenez A, Bogdanovic N, Winblad B and Cedazo-Minguez A.** (2006) Involvement of glutaredoxin-1 and thioredoxin-1 in beta-amyloid toxicity and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ*, **13**, 1454-1465.

**Alam J and Cook JL.** (1990) Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem*, **188**, 245-254.

**Alexander RW.** (1995) Theodore Cooper memorial lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension*, **25**, 155-161.

**Andersen PL, Zhou H, Pastushok L, Moraes T, McKenna S, Ziola B, Ellison MJ, Dixit VM and XiaoW.** (2005) Distinct regulation of Ubc13 functions by the two ubiquitin-conjugating enzyme variants Mms2 and Uev1A. *J Cell Biol*, **170**, 745-755.

**Anderson ME.** (1997) Glutathione and glutathione delivery compounds. *Adv Pharmacol*, **38**, 65-78.

**Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S and Randall RE.** (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17264-17269.

**Anestal K and Arner ES.** (2003) Rapid induction of cell death by selenium-compromised thioredoxin reductase 1 but not by the fully active enzyme containing selenocysteine. *J Biol Chem*, **278**, 15966-15972.

**Aota M, Matsuda K, Isowa N, Wada H, Yodoi J and Ban T.** (1996) Protection against reperfusion-induced arrhythmias by human thioredoxin. *J Cardiovasc Pharmacol*, **27**, 727–732.

**Applegate MA, Humphries KM and Szweda LI.** (2008) Reversible inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase by hydrogen peroxide: glutathionylation and protection of lipoic acid. *Biochemistry*, **47**, 473-478.

**Araujo V, Arnal C, Boronat M, Ruiz E and Domvnguez C.** (1998) Oxidant-antioxidant imbalance in blood of children with juvenile rheumatoid arthritis. *Biofactors*, **8**, 155-159.

**Arch RH, Gedrich RW and Thompson CB.** (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)-a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev*, **12**, 2821-2830.

**Armstrong RN.** (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol*, **10**, 2-18.

**Arner ES.** (2009) Focus on mammalian thioredoxin reductases — Important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta*, **1790**, 495-526.

**Arner ES and Holmgren A.** (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*, **267**, 6102-6109.

**Arcott LD, Gromer S, Schirmer RH, Becker K and Williams CH Jr.** (1997) The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3621-3626.

**Ascenzi P, Salvati L, Bolognesi M, Colasanti M, Polticelli F and Venturini G.** (2001) Inhibition of cysteine protease activity by NO-donors. *Curr Protein Pept Sci*, **2**, 137-153.

**Aust SD, Roerig DL and Pederson TC.** (1972) Evidence for superoxide generation by NADPH-cytochrome c reductase of rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun*, **47**, 1133-1137.

**Bach EA, Aguet M and Schreiber RD.** (1997) The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*, **15**, 563-591.

**Balaban RS, Nemoto S and Finkel T.** (2005) Mitochondria, oxidants and aging. *Cell*, **120**, 483-495.

**Balachandran S, Thomas E and Barber GN.** (2004) A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature*, **432**, 401-405.

**Balatri E, Banci L, Bertini I, Cantini F and Cioffi-Baffoni S.** (2003) Solution structure of Sco1: a thioredoxin-like protein involved in cytochrome c oxidase assembly. *Structure*, **11**, 1431-1443.

**Banci L, Bertini I, Cioffi-Baffoni S, Hadjiloi T, Martinelli M and et al.** (2008) Mitochondrial copper(I) transfer from Cox17 to Sco1 is coupled to electron transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**, 6803-6808.

**Bandyopadhyay S, Starke DW, Mieyal JJ and Gronostajski RM.** (1998) Thioltransferase (glutaredoxin) reactivates the DNA-binding activity of oxidation-inactivated nuclear factor I. *J Biol Chem*, **273**, 392-397.

**Barrett WC, DeGnore JP, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB and Chock PB.** (1999) Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*, **274**, 34543-34546.

**Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y and Karin M.** (1999) Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev*, **13**, 1297-1308.

**Baynes JW.** (1991) Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, **40**, 405-412.

**Beg, A.A. and Baltimore, D.** (1996) An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, **274**, 782-784.

**Belogradov GI and Hatefi Y.** (2002) Factor B and the mitochondrial ATP synthase complex. *J Biol Chem*, **277**, 6097-6103.

**Berggren M, Gallegos A, Gasdaska JR, Gasdaska PY, Warneke J and Powis G.** (1996) Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. *Anticancer Res*, **16**, 3459-3466.

**Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM and Hannon GJ.** (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.

**Bertelsen M and Sanfridson A.** (2007) TAB1 modulates IL-1a mediated cytokine secretion but is dispensable for TAK1 activation. *Cell Signal*, **19**, 646-657.

**Bertini R, Howard OM, Dong HF, Oppenheim JJ, Bizzarri C, Sergi R, Caselli G, Pagliei S, Romines B, Wilshire JA, Mengozzi M, Nakamura H, Yodoi J, Pekkari K, Gurunath R, Holmgren A, Herzenberg LA and Ghezzi P.** (1999) Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med*, **189**, 1783-1789.

**Betteridge DJ.** (2000) What is oxidative stress? *Metabolism*, **49**, 3-8.

**Beutler, B., Jiang, Z., Georgel, P., Crozat, K., Croker, B., Rutschmann, S., Du, X. and Hoebe, K.** (2006) Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol*, **24**, 353-389.

**Biaglow JE and Miller RA.** (2005) The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*, **4**, 6-13.

**Boehm U, Klamp T, Groot M and Howard JC.** (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, **15**, 749-795.

**Bondareva AA, Capecchi MR, Iverson SV, Li Y, Lopez NI, Lucas O, Merrill GF, Prigge JR, Siders AM, Wakamiya M, Wallin SL and Schmidt EE.** (2007) Effects of thioredoxin reductase-1 deletion on embryogenesis and transcriptome. *Free Radic Biol Med*, **43**, 911–923.

**Boveris A, Oshino N and Chance B.** (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J*, **128**, 617-630.

**Bowie A and O'Neill LA.** (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol*, **67**, 508-514.

**Bowie AG and Haga IR.** (2005) The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol*, **42**, 859-867.

**Bradley J and Pober JS.** (2001) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene*, **20**, 6482-6491.

**Bragadin M, Scutari G, Folda A, Bindoli A and Rigobello MP.** (2004) Effect of metal complexes on thioredoxin reductase and the regulation of mitochondrial permeability conditions. *Ann N Y Acad Sci*, **1030**, 348-354.

**Brar, S., Grigg, C, Wilson, KS, Holder, JrWD, Dreau, D, Austin, C, Foster, M, Ghio, AJ, Whorton, AR, Stowell, GW, Whittall, LB, Whittle, RR, White, DP, Kennedy, TP.** (2004) Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP. responsive element binding protein and human melanoma growth in a metaldependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Mol Cancer Ther*, **3**, 1049–1060.

**Brigelius R, Lenzen R and Sies H.** (1982) Increase in hepatic mixed disulphide and glutathione disulphide levels elicited by paraquat. *Biochem Pharmacol Ther*, **31**, 1637–1641.

**Brigelius R, Muckel C, Akerboom TP and Sies H.** (1983) Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol Ther*, **32**, 2529–2534.

**Brikos C and O'Neill LA.** (2008) Signalling of Toll-Like Receptors. *Handb Exp Pharmacol*, **183**, 21-50.

**Brint EK, Fitzgerald KA, Smith P, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Fallon PG and O'Neill LA.** (2002) Characterization of signaling pathways activated by the interleukin 1 (IL-1) receptor homologue T1/ST2. A role for Jun N-terminal kinase in IL-4 induction. *J Biol Chem*, **277**, 49205-49211.

**Bronstein I, Fortin J, Stanley PE, Stewart GS and Kricka LJ.** (1994) Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Anal. Biochem*, **219**, 169-181.

**Brown, G.** (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, **6**, 33-43.

**Brugarolas J and Kaelin WG Jr.** (2004) Dysregulation of HIF and VEGF is a unifying feature of the familial amartoma syndromes. *Cancer Cell*, **6**, 7–10.

- Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW and Kaelin WG Jr.** (2004) Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*, **18**, 2893–2904.
- Bruick RK and McKnight SL.** (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, **294**, 1337-1340.
- Bróne B and Zhou J.** (2003) The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Curr Med Chem*, **10**, 845–855.
- Buckman JF and Reynolds IJ.** (2001) Spontaneous changes in mitochondrial membrane potential in cultured neurons. *J Neurosci*, **21**, 5054–5065.
- Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, Lewis A, Ray K, Tschopp J and Volpe F.** (2000) Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol*, **2**, 346-351.
- Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer JL, Di Marco F, French L and Tschopp J.** (1998) MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem*, **273**, 12203–12209.
- Bushweller JH, Billeter M, Holmgren A and K, W.** (1994) The nuclear magnetic resonance solution structure of the mixed disulfide between Escherichia coli glutaredoxin (C14S) and glutathione. *J Mol Biol*, **235**, 1585–1597.
- Bushweller JH, Eslund F, Wuthrich K and Holmgren A.** (1992) Structural and functional characterization of the mutant Escherichia coli glutaredoxin (C14<sup>®</sup>rr;S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochemistry*, **31**, 9288–9293.
- Butler MP, Hanly JA and Moynagh PN.** (2007) Kinase-active interleukin-1 receptor-associated kinases promote polyubiquitination and degradation of the pellino family. *J Biol Chem*, **282**, 29729-29737.
- Callebaut I, Curcio-Morelli C, Mornon JP, Gerebem B, Buettner C, Huang S, Castr B, Fonseca TL, Harney JW, Larsen PR and Bianco AC.** (2003) The iodothyronine selenodeiodinases are thioredoxin-fold family proteins containing a glycoside hydrolase clan GH-A-like structure. *J Biol Chem*, **278**, 36887–36896.
- Cao Z, Henzel WJ and Gao X.** (1996a) IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science*, **271**, 1128-1131.
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T and Goeddel DV.** (1996b) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*, **383**, 443-446.
- Capdevila J, Parkhill L, Chacos N, Okita R, Masters BS and Estabrook RW.** (1981) The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P-450. *Biochem Biophys Res Commun*, **101**, 1357-1363.

**Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H and Poellinger L.** (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Mol Cell Biol*, **20**, 402-415.

**Casagrande S, Bonetto V, Fratelli M, Gianazza E, Eberini I, Massignan T, Salmona M, Chang G, Holmgren A and Ghezzi P.** (2002) Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9745-9749.

**Casagrande, S., Bonetto, V, Fratelli, M, Gianazza, E, Eberini, I, Massignan, T, Salmona, M, Chang, G, Holmgren, A, Ghezzi, P.** (2002) Glutathionylation of human thioredoxin: A possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 9745–9749.

**Cassidy PB, Edes K, Nelson CC, Parsawar K, Fitzpatrick FA and Moos PJ.** (2006) Thioredoxin reductase is required for the inactivation of tumor suppressor p53 and for apoptosis induced by endogenous electrophiles. *Carcinogenesis*, **11**.

**Chang, L. and Karin, M.** (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37–40.

**Chen FC and Ogut O.** (2006) Decline of contractility during ischemia-reperfusion injury: actin glutathionylation and its effect on allosteric interaction with tropomyosin. *Am J Physiol Cell Physiol*, **290**, C719-C727.

**Chen YR, Chen CL, Pfeiffer DR and Zweier JL.** (2007) Mitochondrial complex II in the post-ischemic heart: oxidative injury and the role of protein S-glutathionylation. *J Biol Chem*, **282**, 32640-32654.

**Chen ZJ.** (2005) Ubiquitin signalling in the NF- $\kappa$ B pathway. *Nat Cell Biol*, **7**, 758-765.

**Cheng H, Addona T, Keshishian H, Dahlstrand E, Lu C, Dorsch M, Li Z, Wang A, Ocain TD, Li P, Parsons TF, Jaffee B and Xu Y.** (2006) Regulation of IRAK-4 kinase activity via autophosphorylation within its activation loop. *Biochem Biophys Res Commun*, **352**, 609-616.

**Cheung PCF, Nebreda AR and Cohen P.** (2004) TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1. *Biochem J*, **378**, 27-34.

**Chomczynski, P., Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**.

**Chrestensen, C., Starke, DW, Mieyal, JJ.** (2000) Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (Glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. *J Biol Chem*, **275**, 26556-26565.

**Chu, F., Ward, NE, O'Brian, CA.** (2001) Potent inactivation of representative members of each PKC isozyme subfamily and PKD via S-thiolation by the tumor-promotion/progression antagonist glutathione but not by its precursor cysteine. *Carcinogenesis*, **22**, 1221–1229.

**Chung J, Park YC, Ye H and Wu H.** (2002) All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci*, **115**, 679-688.

**Clavreul N, Adachi T, Pimental DR, Ido Y, Schoneich C and Cohen RA.** (2006a) S-glutathiolation by peroxynitrite of p21ras at cysteine-118 mediates its direct activation and downstream signaling in endothelial cells. *FASEB J*, **20**, 518-520.

**Clavreul N, Bachschmid MM, Hou X, Shi C, Idrizovic A, Ido Y, Pimentel D and Cohen RA.** (2006b) S-glutathiolation of p21ras by peroxynitrite mediates endothelial insulin resistance caused by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 2454-2461.

**Clissold PM and Bicknell R.** (2003) The thioredoxin-like fold: hidden domains in protein disulfide isomerases and other chaperone proteins. *Bioessays*, **25**, 603-611.

**Cohen L, Henzel WJ and Baeuerle PA.** (1998) IKAP is a scaffold protein of the I $\kappa$ B kinase complex. *Nature*, **395**, 292-296.

**Collet JF and Bardwell JCA.** (2002) Oxidative protein folding in bacteria. *Mol Microbiol*, **44**, 1-8.

**Collins SE, Noyce RS and Mossman KL.** (2004) Innate cellular response to virus particle entry requires IRF-3 but not virus replication. *J Virol*, **78**, 1706-1717.

**Commoner B, Townsend J and Pake GE.** (1954) Free radicals in biological materials. *Nature*, **174**, 689-691.

**Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippl S, Banjac A, Schneider M, Beck H, Hatzopoulos AK, Just U, Sinowatz F, Schmahl W, Chien KR, Wurst W, Bornkamm GW and Brielmeier M.** (2004) Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol Cell Biol*, **24**, 9414-9423.

**Cotgreave IA, Gerdes R, Schuppe-Koistinen I and Lind C.** (2002) S-glutathionylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: role of thiol oxidation and catalysis by glutaredoxin. *Methods Enzymol*, **348**, 175-182.

**Covert MW, Leung TH, Gaston JE and Baltimore D.** (2005) Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B activation. *Science*, **309**, 1854-1857.

**Cross JV and DJ., T.** (2004) Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain. *Biochem J*, **381**, 675-683.

**Cunnea PM, Miranda-Vizuete A, Bertoli G, Simmen T, Damdimopoulos AE, Hermann S, Leinonen S, Huikko MP, Gustafsson JA, Sitia R and G, S.** (2003) ERdj5, an ER-Resident protein containing DnaJ and thioredoxin domains, is expressed in secretory cells or following ER Stress. *J Biol Chem*, **278**, 1059-1066.

**Cusson-Hermance N, Khurana S, Lee TH, Fitzgerald KA and Kelliher MA.** (2005) Rip1 mediates the Trif-dependent Toll-like receptor 3- and 4-induced NF- $\kappa$ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem*, **280**, 36560-36566.

**Daily D, Vlamis-Gardikas A, Offen D, Mittelman L, Melamed E, Holmgren A and Barzilai A.** (2001) Glutaredoxin protects cerebellar granule neurons from dopamine-induced apoptosis by dual

activation of the ras-phosphoinositide 3-kinase and jun n-terminal kinase pathways. *J Biol Chem*, **276**, 21618-21626.

**Dalle-Donne I, Giustarini D, Rossi R, Colombo R and Milzani A.** (2003a) Reversible S-glutathionylation of Cys 374 regulates actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. *Free Radic Biol Med*, **34**, 23-32.

**Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo G, Giustarini D and Milzani A.** (2009) Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci*, **34**, 85-96.

**Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R and Milzani A.** (2003b) Actin S-glutathionylation: evidence against a thiol-disulphide exchange mechanism. *Free Radic Biol Med*, **35**, 1185-1193.

**Dalton TP, Shertzer HG and Puga A.** (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**, 67-101.

**Damdimopoulos AE, Miranda-Vizueté A, Pelto-Huikko M, Gustafsson JA and Spyrou G.** (2002) Human mitochondrial thioredoxin. Involvement in mitochondrial membrane potential and cell death. *J Biol Chem*, **277**, 33249-33257.

**Darnay BG, Ni J, Moore PA and Aggarwal BB.** (1999) Activation of NF-kappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-kappaB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J Biol Chem*, **274**, 7724-7731.

**Das KC, Guo XL and White CW.** (1999a) Hyperoxia induces thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in lungs of premature baboons with respiratory distress and bronchopulmonary dysplasia. *Chest*, **116**, 101S.

**Das KC, Guo XL and White CW.** (1999b) Induction of thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in lungs of newborn primates by oxygen. *Am J Physiol*, **276**, L530-539.

**Davis DA, Dorsey K, Wingfield PT, Stahl SJ, Kaufman J, Fales HM and Levine RL.** (1996) Regulation of HIV-1 protease activity through cysteine modification. *Biochemistry*, **35**, 2482-2488.

**de Belder AJ, MacAllister R, Radomski MW, Moncada S and Vallance PJ.** (1994) Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation. *Cardiovasc Res*, **28**, 691-694.

**De Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR and Subramani S.** (1987) Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **7**, 725-737.

**Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C and Chen ZJ.** (2000) Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, **103**, 351-361.

**Dunne A and O'Neill LA.** (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Science STKE*, **171**, re:3.



- Ehrlund A, Anthonisen EH, Gustafsson N, Venteclef N, Robertson Remen K, Damdimopoulos AE, Galeeva A, Pelto-Huikko M, Lalli E, Steffensen KR, Gustafsson JA and Treuter E.** (2009) E3 ubiquitin ligase RNF31 cooperates with DAX-1 in transcriptional repression of steroidogenesis. *Mol Cell Biol*, **29**, 2230-2242.
- Elbashir SM, Lendeckel W and Tuschl T.** (2001) RNA interference is mediated by 21 and 22 nt RNAs. *Genes Dev*, **15**, 188–200.
- Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L and Fujii-Kuriyama Y.** (1999) Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J*, **18**, 1905-1914.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ and Ratcliffe PJ.** (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, **107**, 43-54.
- Escalante CR, Yie J, Thanos D and Aggarwal AK.** (1998;) Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. *Nature*, **391**, 103–106.
- Fahey RC, Hunt JS and GC, W.** (1977) On the cysteine and cystine content of proteins. Differences between intracellular and extracellular proteins. *J Mol Evol*, **10**, 155-160.
- Fernandes AP and Holmgren A.** (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal*, **6**, 63–74.
- Ferrari DM and Sϕling HD.** (1999) The protein disulfide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J*, **339**, 1–10.
- Fiaschi T, Cozzi G, Raugei G, Formigli L, Ramponi G and Chiarugi P.** (2006) Redox regulation of beta-actin during integrin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem*, **281**, 22983-22991.
- Finkel T and Holbrook NJ.** (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**, 239-247.
- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM and Maniatis T.** (2003a) IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*, **5**, 491-496.
- Fitzgerald KA and O'Neill LA.** (2000) The role of the interleukin-1/Toll-like receptor superfamily in inflammation and host defence. *Microbes Infect*, **2**, 933-943.
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM and Golenbock DT.** (2003b) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*, **198**, 1043-1055.

- Ford E and Thanos D.** (2010) The transcriptional code of human IFN- $\beta$  gene expression. *Biochim Biophys Acta*, **1799**, 328-336.
- Forman, H., Fukuto, J, Torres, M.** (2003) Signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Dordrecht, The Netherlands: Kluwer*.
- Fratelli M, Demol H, Puype M, Casagrande S, Villa P, Eberini I, Vandekerckhove J, Gianazza E and Ghezzi P.** (2003) Identification of proteins undergoing glutathionylation in oxidatively stressed hepatocytes and hepatoma cells. *Proteomics*, **3**, 1154-1161.
- Freeman BA and Crapo JD.** (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, **47**, 412-426.
- Fridovich I.** (1999) Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci*, **893**, 13-18.
- Friedman, M.** (1973) Chemistry and biochemistry of the sulfhydryl group in amino acids, peptides, and proteins. *Oxford: Pergamon Press Ltd*.
- Fujii S, Nanbu Y, Konishi I, Mori T, Masutani H and Yodoi J.** (1991a) Immunohistochemical localization of adult T-cell leukaemia-derived factor, a human thioredoxin homologue, in human fetal tissues. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, **419**, 317-326.
- Fujii S, Nanbu Y, Nonogaki H, Konishi I, Mori T, Masutani H and Yodoi J.** (1991b) Coexpression of adult T-cell leukemia-derived factor, a human thioredoxin homologue, and human papillomavirus DNA in neoplastic cervical squamous epithelium. *J Cancer*, **68**, 1583-1591.
- Fujita T, Onoguchi K, Onomoto K, Hirai R and Yoneyama M.** (2007) Triggering antiviral response by RIG-I-related RNA helicases. *Biochimie*, **89**, 754-760.
- Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM and Semenza GL.** (2002) Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem*, **277**, 38205–38211.
- Fukushima T, Matsuzawa SI, Kress CL, Bruely JM, Krajewska M, Lefebvre S, Zapata JM, Ronai Z and Reed JC.** (2007) Ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 is a critical component of TNF receptor-associated factor (TRAF)-mediated inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 6371-6376.
- Gallogly MM and Mieyal JJ.** (2007) Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr Opin Pharmacol*, **7**, 381-391.
- Gallogly MM, Starke DW and Mieyal J.** (2009) Mechanistic and kinetic details of catalysis of thiol-disulfide exchange by glutaredoxins and potential mechanisms of regulation. *Antioxid Redox Signal*, **11**, 1059-1081.

- Garlanda, C., Bottazzi, B., Bastone, A. and Mantovani, A.** (2005) Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol*, **23**, 337-366.
- Gasque, P.** (2004) Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol*, **41**, 1089-1098.
- Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P and Fenn WO.** (1954) Oxygen poisoning and x-irradiation—A mechanism in common. *Science*, **119**, 623–626.
- Ghezzi P.** (2005) Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic Res*, **39**, 573–580.
- Gilbert HF.** (1984) Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods Enzymol*, **107**, 330–351.
- Gilbert HF.** (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **63**, 69-172.
- Gilbert HF.** (1995) Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods Enzymol*, **251**, 8–28.
- Gilbert HF.** (1998) Protein disulfide isomerase. *Methods in Enzymology*, **290**, 26-50.
- Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS and Colonna M.** (2006) Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8459-8464.
- Goch G, Vdovenko S, Kozłowska H and Bierzynski A.** (2005) Affinity of S100A1 protein for calcium increases dramatically upon glutathionylation. *Febs J*, **272**, 2557-2565.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC and Nairn R.** (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
- Grandvaux N, Servant MJ, tenOever B, Sen GC, Balachandran S, Barber GN, Lin R and Hiscott J.** (2002) Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol*, **76**, 5532–5539.
- Gravina S and Mieyal J.** (1993) Thioltransferase is a specific glutathionyl mixed disulfide oxidoreductase. *Biochemistry*, **32**, 3368–3376.
- Grippo, J., Holmgren, A. and Pratt, W.** ( 1985) Proof that the endogenous, heat-stable glucocorticoid receptor-activating factor is thioredoxin. *J Biol Chem*, **260**, 93-97.
- Gromer S, Urig S and Becker K.** (2004) The thioredoxin system-from science to clinic. *Med Res Rev*, **24**, 40-89.
- Guo B and Cheng G.** (2007) Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK. *J Biol Chem*, **282**, 11817–11826.

**Hacker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, Kamps MP, Raz E, Wagner H, Hacker G, Mann M and Karin M.** (2006) Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*, **439**, 204–207.

**Hackett NR, Heguy A, Harvey BG, O'Connor TP, Luettich K, Flieder DB, Kaplan R and Crystal RG.** (2003) Variability of antioxidant-related gene expression in the airway epithelium of cigarette smokers. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **29**, 331–343.

**Haddad JJ, Olver RE and Land SC.** (2000) Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1alpha and NF-kappa B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem*, **275**, 21130-21139.

**Haendeler, J., Hoffmann, J., Tischler, V., Berk, B., Zeiher, A. and Dimmeler, S.** (2002) Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat Cell Biol*, **4**, 743-749.

**Halliwell B.** (1987) Oxidants and human disease: some new concepts. *Faseb J*, **1**, 358-364.

**Halliwell B.** (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*, **16**, 33-50.

**Halliwell B.** (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*, **31**, 261-272.

**Halliwell B and Gutteridge JM.** (1985) The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med*, **8**, 89-193.

**Hammond SM, Caudy AA and Hannon GJ.** (2001) Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*, **2**, 110–119.

**Hansen JM, Zhang H and Jones DP.** (2006) Mitochondrial thioredoxin-2 has a key role in determining tumor necrosis factor-alpha-induced reactive oxygen species generation, NF-kappaB activation, and apoptosis. *Toxicol Sci*, **91**, 643-650.

**Harman D.** (1956) Aging—A theory based on free-radical and radiation-chemistry. *J Gerontol*, **11**, 298–300.

**Harris AL.** (2002) Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Rev Cancer*, **2**, 38–46.

**Hayashi S, Hajiro-Nakanishi K, Makino Y, Eguchi H, Yodoi J and Tanaka H.** (1997) Functional modulation of estrogen receptor by redox state with reference to thioredoxin as a mediator. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4035-4040.

**Hayden MS and Ghosh S.** (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, **132**, 344-362.

**Haziot A, Ferrero E, Kontgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, Stewart CL and Goyert SM.** (1996) Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity*, **4**, 407-414.

**Hemmi H, Takeuchi O, Sato S, Yamamoto M, Kaisho T, Sanjo H, Kawai T, Hoshino K, Takeda K and Akira S.** (2004) The roles of two I $\kappa$ B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med*, **199**, 1641-1650.

**Herrero E and de la Torre-Ruiz MA.** (2007) Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 1518–1530.

**Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM, Ratcliffe PJ, Pugh CW and Schofield CJ.** (2002) Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem*, **277**, 26351-26355.

**Hidalgo C, Sanchez G, Barrientos G and Aracena-Parks P.** (2006) A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S - glutathionylation. *J Biol Chem*, **281**, 26473-26482.

**Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K and Yodoi J.** (1997) AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3633-3638.

**Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K and Yodoi J.** (1999) Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem*, **274**, 27891-27897.

**Hiscott J, Pitha P, Genin P, Nguyen H, Heylbroeck C, Mamane Y, Algarte M and Lin R.** (1999) Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res*, **19**, 1–13.

**Hitchon CA and El-Gabalawy HS.** (2004) Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, **6**, 265-278.

**Ho YS, Xiong Y, Ho DS, Gao J, Chua BH, Pai H and Miesal JJ.** (2007) Targeted disruption of the glutaredoxin 1 gene does not sensitize adult mice to tissue injury induced by ischemia/reperfusion and hyperoxia. *Free Radic Biol Med*, **43**, 1299-1312.

**Hoebe, K., Janssen, E. and Beutler, B.** (2004) The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, **5**, 971-974.

**Holmgren A.** (1968) Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from Escherichia coli. *Eur J Biochem*, **6**, 475-484.

**Holmgren A.** (1976) Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 2275–2279.

**Holmgren A.** (1979) Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Characterization of the enzymatic mechanism of Escherichia coli glutaredoxin. *J Biol Chem*, **254**, 3672–3678.

**Holmgren A.** (1985) Thioredoxin. *Annu Rev Biochem*, **54**, 237-271.

- Holmgren A.** (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem*, **264**, 13963–13966.
- Holmgren A.** (2000) Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid Redox Signal*, **2**, 811-820.
- Holmgren A, Johansson C, Berndt C, Lonn ME, Hudemann C and et al.** (2005) Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem Soc Trans*, **33**, 1375–1377.
- Holmgren A, Ohlsson I and Grankvist ML.** (1978) Thioredoxin from *Escherichia coli*. Radioimmunological and enzymatic determinations in wild type cells and mutants defective in phage T7 DNA replication. *J Biol Chem*, **253**, 430-436.
- Holmgren A, Söderberg BO, Eklund H and Brönden CI.** (1975) Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 2305–2309.
- Holmgren A and Eslund F.** (1995) Glutaredoxin. *Methods Enzymol*, **252**, 283–292.
- Honda K and Taniguchi T.** (2006) IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*, **6**, 644-658.
- Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N and Taniguchi T.** (2005a) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, **434**, 772–777.
- Honda K, Yanai H, Takaoka A and Taniguchi T.** (2005b) Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int Immunol*, **17**, 1367-1378.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N. and Taniguchi, T.** (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, **434**, 772–777.
- Hornig T, Barton GM, Flavell RA and Medzhitov R.** (2002) The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature*, **420**, 329-333.
- Hornig T, Barton GM and Medzhitov R.** (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol*, **2**, 835-841.
- Hu J, Ma X, Lindner DJ, Karra S, Hofmann ER, Reddy SP and Kalvakolanu DV.** (2001) Modulation of p53 dependent gene expression and cell death through thioredoxin-thioredoxin reductase by the Interferon-Retinoid combination. *Oncogene*, **20**, 4235-4248.
- Huang LE, Arany Z, Livingston DM and Bunn HF.** (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its a subunit. *J Biol Chem*, **271**, 32253–32259.
- Huang LE and Bunn HF.** (2003) Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *J Biol Chem*, **278**, 19575–19578.

- Huang LE, Gu J, Schau M and Bunn HF.** (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1a is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin–proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7987–7992.
- Huang M, Qian F, Hu Y, Ang C, Li Z and Wen Z.** (2002) Chromatin-remodelling factor BRG1 selectively activates a subset of interferon- $\alpha$ -inducible genes. *Nat Cell Biol*, **4**, 774–781.
- Huang Z, Pinto JT, Deng H and Richie JP Jr.** (2008) Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation. *Biochem Pharmacol*, **75**, 2234–2244.
- Humphries KM and Sweda LI.** (1998) Selective inactivation of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry*, **37**, 15835–15841.
- Hurd TR, Requejo R, Filipovska A, Brown S, Prime TA, Robinson AJ, Fearnley IM and Murphy MP.** (2008) Complex I within oxidatively stressed bovine heart mitochondria is glutathionylated on Cys-531 and Cys-704 of the 75-kDa subunit: potential role of CYS residues in decreasing oxidative damage. *J Biol Chem*, **283**, 24801–24815.
- Hutvagner G and Zamore PD.** (2002) RNAi: Nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 225–232.
- Hwang C, Sinskey AJ and Lodish HF.** (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, **257**, 1496–1502.
- Ikeda H, Old LJ and Schreiber RD.** (2002) The roles of IFN  $\gamma$  in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*, **13**, 95–109.
- Iles KE and Forman HJ.** (2002) Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res*, **26**, 95–105.
- ISAACS A and LINDENMANN J.** (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **147**, 258–267.
- Ishitani T, Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Shibuya H, Gaynor RB and Matsumoto K.** (2003) Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *EMBO J*, **22**, 6277–6288.
- Ito K and Inaba K.** (2008) The disulfide bond formation (Dsb) system. *Curr Opin Struct Biol*, **18**, 450–458.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS and Jr., K.W.** (2001) HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*, **292**, 464–468.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW and Ratcliffe PJ.** (2001) Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**, 468–472.

**Jakupoglu C, Przemecck GK, Schneider M, Moreno SG, Mayr N., Hatzopoulos AK, de Angelis MH, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M and Conrad M.** (2005) Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol Cell Biol*, **25**, 1980–1988.

**Janeway, C., Jr. and Medzhitov, R.** (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, **20**, 197-216.

**Jiang BH, Semenza GL, Bauer C and Marti HH.** (1996) Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically. *Am J Physiol*, **271**, 1172-1180.

**Jiang Z, Ninomiya-Tsuji J, Qian Y, Matsumoto K and Li X.** (2002) Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasmamembrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol Cell Biol*, **22**, 7158-7167.

**Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Shamel, L., Sovath, S., Mudd, S., Huber, M., Kalis, C., Keck, S., Galanos, C., Freudenberg, M. and Beutler, B.** (2005) CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol*, **6**, 565-570.

**Jikimoto T, Nishikubo Y, Koshiha M, Kanagawa S, Morinobu S, Morinobu A, Saura R, Mizuno K, Kondo S, Toyokuni S, Nakamura H, Yodoi J and Kumagai S.** (2002) Thioredoxin as a biomarker for oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Immunol*, **38**, 765-772.

**Jimenez A, Pelto-Huikko M, Gustafsson JA and Miranda-Vizuete A.** (2006) Characterization of human thioredoxin-like-1: potential involvement in the cellular response against glucose deprivation. *FEBS Lett*, **580**, 960-967.

**Jimenez A, Zu W, Rawe VY, Pelto-Huikko M, Flickinger CJ, Sutovsky P, Gustafsson JA, Oko R and Miranda-Vizuete A.** (2004) Spermatocyte/spermatid-specific thioredoxin-3, a novel Golgi apparatus-associated thioredoxin, is a specific marker of aberrant spermatogenesis. *J Biol Chem*, **279**, 34971–34982.

**Jin W, Chang M, Paul EM, Babu G, Lee AJ, Reiley W, Wright A, Zhang M, You J and Sun SC.** (2008) Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates RANK signalling and osteoclastogenesis in mice. *J Clin Invest*, **118**, 1858-1866.

**Johansson L, Gafvelin G and Arnur ESJ.** (2005) Selenocysteine in proteins — properties and biotechnological use. *Biochim Biophys Acta*, **1726**, 1–13.

**Juang YT, Lowther W, Kellum M, Au WC, Lin R, Hiscott J and Pitha PM.** (1998) Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9837–9842.

**Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M and Handa H.** (2005) Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal*, **7**, 395-403.



**Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S and Medzhitov R.** Tram couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol*, **9**, 361-368.

**Kalvakolanu DV.** (2000) Interferons and cell growth control. *Histol Histopathol*, **15**, 523-537.

**Kamata H and Hirata H.** (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*, **11**, 1-14.

**Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, Shaito A, ChiuYH, Deng L and Chen ZJ.** (2004) TAB2 and TAB3 activate the NF- $\kappa$ B pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell*, **15**, 535-548.

**Karimpour S, Lou J, Lin LL, Rene LM, Lagunas L, Ma X, Karra S, Bradbury CM, Markovina S, Goswami PC, Spitz DR, Hirota K, Kalvakolanu DV, Yodoi J and Gius D.** (2002) Thioredoxin reductase regulates AP-1 activity as well as thioredoxin nuclear localization via active cysteines in response to ionizing radiation. *Oncogene*, **21**, 6317-6327.

**Karin, M.** (1996) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **351**, 127-134.

**Kasuno K, Takabuchi S, Fukuda K, Kizaka-Kondoh S, Yodoi J, Adachi T, Semenza GL and Hirota K.** (2004) Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Biol Chem*, **279**, 2550-2558.

**Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O and Akira S.** (2005) Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*, **23**, 19-28.

**Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T and Akira S.** (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, **441**, 101-105.

**Katze MG, He Y and Gale M Jr.** (2002) Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol*, **2**, 675-687.

**Kawai T and Akira S.** (2007a) Antiviral Signaling Through Pattern Recognition Receptors. *J Biochem*, **141**, 137-145.

**Kawai T and Akira S.** (2007b) Signaling to NF- $\kappa$ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*, **13**, 460-469.

**Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O and Akira S.** (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*, **6**, 981-988.

**Kemmerling U, Munoz P, Muller M, Sanchez G, Aylwin ML, Klann E, Carrasco MA and Hidalgo C.** (2007) Calcium release by ryanodine receptors mediates hydrogen peroxide-induced activation of ERK and CREB phosphorylation in N2a cells and hippocampal neurons. *Cell Calcium*, **41**, 491-502.

- Kempner ES and Pestka S.** (1986) Radiation inactivation and target size analysis of interferons. *Methods Enzymol*, **119**, 255-260.
- Kil IS and Park JW.** (2005) Regulation of mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase activity by glutathionylation. *J Biol Chem*, **280**, 10846-10854.
- Kim JR, Lee SM, Cho SH, Kim JH, Kim BH, Kwon J, Choi CY, Kim YD and Lee SR.** (2004) Oxidation of thioredoxin reductase in HeLa cells stimulated with tumor necrosis factor- $\alpha$ . *FEBS Lett*, **567**, 189-196.
- Kim MR, Chang HS, Kim BH, Kim S, Baek SH, Kim JH, Lee SR and Kim JR.** (2003) Involvements of mitochondrial thioredoxin reductase (TrxR2) in cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**, 119-124.
- Kirlin WG, Cai J, Thompson SA, Diaz D, Kavanagh TJ and Jones DP.** (1999) Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radic Biol Med*, **27**, 1208-1218.
- Klatt P, Pineda-Molina E, de Lacoba MG, Padilla CA, Martinez-Galisteo E, Barcena JA and Lamas S.** (1999) Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathionylation. *FASEB J*, **13**, 1481-1490.
- Koh MY, Spivak-Kroizman TR and Powis G.** (2008) HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci*, **33**, 526-534.
- Koharyova M and Kolarova M.** (2008) Oxidative stress and thioredoxin system. *Gen Physiol Biophys*, **27**, 71-84.
- Kohl R, Zhou J and Brune B.** (2006) Reactive oxygen species attenuate nitricoxide-mediated hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  stabilization. *Free Radic Biol Med*, **40**, 1430-1442.
- Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI and Myllyharju J.** (2004) Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem*, **279**, 9899-9904.
- Kollar B, Buranova D, Goldenberg Z, Klobucnikova K and Varsik P.** (2006) Solitary epileptic seizure – the risk of recurrence. *Neuroendocrinol Lett*, **27**, 16-20.
- Kollewe C, Mackensen AC, Neumann D, Knop J, Cao P, Li S, Wesche H and Martin MU.** (2004) Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem*, **279**, 5227-5236.
- Kondo K and Kaelin WG.** (2001) The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res*, **264**, 117-125.
- Konno H, Yamamoto T, Yamazaki K, Gohda J, Akiyama T, Semba K, Goto H, Kato A, Yujiri T, Imai T, Kawaguchi Y, Su B, Takeuchi O, Akira S, Tsunetsugu-Yokota Y and Inoue J.** (2009) TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF- $\kappa$ B and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA. *PLoS One*, **4**, e5674.

- Konorev EA, Tarpey MM, Joseph J, Baker JE and Kalyanaraman B.** (1995) S-nitrosoglutathione improves functional recovery in the isolated rat heart after cardioplegic ischemic arrest-evidence for a cardioprotective effect of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*, **274**, 200-206.
- Kosower NS and Kosower EM.** (1987) Formation of disulfides with diamide. *Methods Enzymol*, **143**, 264–270.
- Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H and Donnelly RP.** (2003) IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, **4**, 69-77.
- Koutroubas, G., Merika, M, Thanos, D.** (2008) Bypassing the requirements for epigenetic modifications in gene transcription by increasing enhancer strength. *Mol Cell Biol*, **28**, 926-938.
- Krause CD and Pestka S.** (2005) Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. *Pharmacol Ther*, **106**, 299-346.
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehrab O, Guigo R and Gladyshev VN.** (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, **300**, 1439–1443.
- Kumar JK, Tabor S and Richardson CC.** (2004) Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3759-3764.
- Kung AL, Wang S, Klco JM, Kaelin WG and Livingston DM.** (2000) Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med*, **6**, 1335-1340.
- Kuppusamy P and Zweier JL.** (1989) Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem*, **264**, 9880-9884.
- Kuriyan J, Krishna TSR, Wong L, Guenther B, Pahler A, Williams CHJ and Model P.** (1991) Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. *Nature*, **352**, 172–174.
- Kyriakis JM and Avruch J.** (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, **81**, 807–869.
- LaFleur DW, Nardelli B, Tsareva T, Mather D, Feng P, Semenuk M, Taylor K, Buergin M, Chinchilla D, Roshke V, Chen G, Ruben SM, Pitha PM, Coleman TA and Moore PA.** (2001) Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem*, **276**, 39765–39771.
- Lamothe B, Besse A, Campos AD, Webster WK, Wu H and Darnay BG.** (2007) Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *J. Biol. Chem.*, **282**, 4102–4112.
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML and Bruck RK.** (2002) FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*, **16**, 1466-1471.

**Langer JA, Cutrone EC and Kotenko S.** (2004) The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor–ligand interactions. *Cytokine Growth Factor Rev*, **15**, 33–48.

**Langer JA, Rashidbaigi A, Garotta G and Kempner E.** (1994) Radiation inactivation of human gamma-interferon: cellular activation requires two dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **21**, 5818-5822.

**Larson G and Larsson A.** (1972) Purification and properties of rat-liver thioredoxin. *Eur J Biochem*, **26**, 119-124.

**Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC and Semenza GL.** (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*, **21**, 3995–4004.

**Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, Yu ZX, Ferrans VJ, Howard BH and Finkel T.** (1999) Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, **274**, 7936-7940.

**Lee C, Kim SJ, Jeong DG, Lee SM and Ryu SE.** (2003) Structure of human HIF-1 reveals a unique active site pocket and interaction sites for HIF-1 and von Hippel-Lindau. *J Biol Chem*, **278**, 7558-7563.

**Lee FS, Peters RT, Dang LC and Maniatis T.** (1998) MEKK1 activates both I $\kappa$ B kinase alpha and I $\kappa$ B kinase beta. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 9319–9324.

**Lee, H., Duzendorfer, S., Soldau, K. and Tobias, P.** (2006) Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity*, **24**, 153-163.

**Lee WL and Downey GP.** (2001) Neutrophil activation and acute lung injury. *Curr Opin Crit Care*, **7**, 1-7.

**Lefevre F, Guillomot M, D'Andrea S, Battegay S and La Bonnardiere C.** (1998) Interferon-delta: the first member of a novel type I interferon family. *Biochimie*, **80**, 779–788.

**Lenzi HL, Mednis AD and Dessein AJ.** (1985) Activation of human eosinophils by monokines and lymphokines: source and biochemical characteristics of the eosinophil cytotoxicity-enhancing activity produced by blood mononuclear cells. *Cell Immunol*, **94**, 333–346.

**Lesur O, Berthiaume Y, Blaise G, Damas P, Deland E, Guimond JG and Michel RP.** (1999) Acute respiratory distress syndrome: 30 years later. *Can Respir J*, **6**, 71-86.

**Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF and Verma IM.** (1999) Severe liver degeneration in mice lacking the I $\kappa$ B kinase 2 gene. *Science*, **284**, 321–325.

**Li S, Strelow A, Fontana EJ and Wesche H.** (2002) IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5567-5572.

**Li X, Commane M, Burns C, Vithalani K, Cao Z and Stark GR.** (1999) Mutant cells that do not respond to interleukin-1 (IL-1) reveal a novel role for IL-1 receptor-associated kinase. *Mol Cell Biol*, **19**, 4643-4652.

**Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G and Chen ZJ.** (2005) Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17717–17722.

**Li XH, Fang X and Gaynor RB.** (2001) Role of IKK $\gamma$ /NEMO in assembly of the I $\kappa$ B kinase complex. *J Biol Chem*, **276**, 4494–4500.

**Lillig CH, Berndt C and Holmgren A.** (2008) Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta*, **1780**, 1304-1317.

**Lillig CH and Holmgren A.** (2007) Thioredoxin and related molecules—from biology to health and disease. *Antioxid Redox Signal*, **9**, 25–47.

**Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM and Hiscott J.** (1998) Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*, **18**, 2986–2996.

**Lin R, Lacoste J, Nakhaei P, Sun Q, Yang L, Paz S, Wilkinson P, Julkunen I, Vitour D, Meurs E and Hiscott J.** (2006) Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKe $\epsilon$  molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J Virol*, **80**, 6072–6083.

**Lin R, Mamane Y and Hiscott J.** (1999) Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol*, **19**, 2465–2474.

**Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P.M. and Hiscott, J.** (1998) Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*, **18**, 2986-2996.

**Lind C, Gerdes R, Schuppe-Koistinen I and Cotgreave IA.** (1998) Studies on the mechanism of oxidative modification of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by glutathione: catalysis by glutaredoxin. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 481–486.

**Livak KJ and Schmittgen TD.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods*, **25**, 402-408.

**Lomaga MA, Yeh W-C, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV and Mak TW.** (1999) TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev*, **13**, 1015-1024.

**Loo YM, Owen DM, Li K, Erickson AK, Johnson CL, Fish PM, Carney DS, Wang T, Ishida H, Yoneyama M, Fujita T, Saito T, Lee WM, Hagedorn CH, Lau DT, Weinman SA, Lemon SM and**

**Gale MJ.** (2006) Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6001–6006.

**Lowther WJ, Moore PA, Carter KC and Pitha PM.** (1999) Cloning and functional analysis of the human IRF-3 promoter. *DNA Cell Biol*, **18**, 685–692.

**Luftig M, Prinarakis E, Yasui T, Tschritzis T, Cahir-McFarland E, Inoue J, Nakano H, Mak TW, Yeh WC, Li X, Akira S, Suzuki N, Suzuki S, Mosialos G and Kieff E.** (2003) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activation of NF-kappaB through IRAK1 and TRAF6. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 15595–15600.

**Lye E, Mirtsos C, Suzuki N, Suzuki S and Yeh WC.** (2004) The role of interleukin 1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) kinase activity in IRAK-4-mediated signaling. *J Biol Chem*, **279**, 40653–40658.

**Lysell J, Stjernholm Vladic Y, Ciarlo N, Holmgren A and Sahlin L.** (2003) Immunohistochemical determination of thioredoxin and glutaredoxin distribution in the human cervix, and possible relation to cervical ripening. *Gynecol Endocrinol*, **17**, 303-310.

**Ma X, Hu J, Lindner DJ and Kalvakolanu DV.** (2002) Mutational analysis of human thioredoxin reductase 1. Effects on p53-mediated gene expression and interferon and retinoic acid-induced cell death. *J Biol Chem*, **277**, 22460-22468.

**Ma X, Karra S, Guo W, Lindner DJ, Hu J, Angell JE, Hofmann ER, Reddy SP and Kalvakolanu DV.** (2001) Regulation of interferon and retinoic acid-induced cell death activation through thioredoxin reductase. *J Biol Chem*, **276**, 24843-24854.

**Mahon PC, Hirota K and Semenza GL.** (2001) FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*, **15**, 2675-2686.

**Makino Y, Okamoto K, Yoshikawa N, Aoshima M, Hirota K, Yodoi J, Umesono K, Makino I and Tanaka H.** (1996) Thioredoxin: a redox-regulating cellular cofactor for glucocorticoid hormone action. Crosstalk between endocrine control of stress response and cellular antioxidant defense system. *J Clin Invest*, **98**, 2469-2477.

**Makino Y, Yoshikawa N, Okamoto K, Hirota K, Yodoi J, I, M. and Tanaka H.** (1999) Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function. *J Biol Chem*, **274**, 3182-3188.

**Malik G, Nagy N, Ho YS, Maulik N and Das DK.** (2008) Role of glutaredoxin-1 in cardioprotection: an insight with Glrx1 transgenic and knockout animals. *J Mol Cell Cardiol*, **44**, 261-269.

**Malmgaard, L.** (2004) Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res*, **24**, 439-454.

**Mannervik, B., Axelsson, K, Sundewall, AC, Holmgren, A.** (1983) Relative contributions of thioltransferase-and thioredoxindependent systems in reduction of low-molecular-mass and protein disulphides. *Biochem J*, **213**, 519–523.

**Mariathasan, S., Weiss, D., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W., Weinrauch, Y., Monack, D. and Dixit, V.** (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, **440**, 228-232.

**Marie I, Durbin JE and Levy DE.** (1998) Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J*, **17**, 6660–6669.

**Martin JL.** (1995) Thioredoxin-a fold for all reasons. *Structure*, **3**, 245–250.

**Martin MU and Wesche H.** (2002) Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 265-280.

**Martindale JL and Holbrook NJ.** (2002) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*, **192**, 1-15.

**Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW and Ratcliffe PJ.** (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*, **20**, 5197-5206.

**Masutani H, Hirota K, Sasada T, Ueda-Taniguchi Y, Taniguchi Y, Sono H and Yodoi J.** (1996) Transactivation of an inducible anti-oxidative stress protein, human thioredoxin by HTLV-I Tax. *Immunol Lett*, **54**, 67-71.

**Masutani H, Ueda S and Yodoi J.** (2005) The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death Differ*, **12 Suppl 1**, 991-998.

**Mathews WR and Kerr SW.** (1993) Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*, **267**, 1529-1537.

**Matsui M, Oshima M, Oshima H, Takaku K, Maruyama T, Yodoi J and Taketo MM.** (1996) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol*, **178**, 179-185.

**Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, Koyasu S, Matsumoto K, Takeda K and Ichijo H.** (2005) ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol*, **6**, 587-592.

**Matzke M, Matzke AJM and Kooter JM.** (2001) RNA: Guiding gene silencing. *Science*, **293**, 1080–1083.

**Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER and Ratcliffe PJ.** (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, **399**, 271-275.

**McCord JM and Fridovich I.** (1969) Superoxide dismutase. an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, **244**, 6049–6055.

**McGettrick AF and O'Neill LA.** (2004) The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Mol Immunol*, **41**, 577-582.

**McNeill LA, Hewitson KS, Claridge TD, Seibel JF, Horsfall LE and Schofield CJ.** (2002) Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803. *Biochem J*, **367**, 571-575.

**McWhirter SM, Fitzgerald KA, Rosains J, Rowe DC, Golenbock DT and Maniatis T.** (2004) IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 233-238.

**Medzhitov R, Preston-Hurlburt P and Janeway CA Jr.** (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, **388**, 394-397.

**Medzhitov, R. and Janeway, C.A., Jr.** (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, **296**, 298-300.

**Meister A.** (1994) Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem*, **269**, 9397-9400.

**Meister A and Tate SS.** (1976) Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem*, **45**, 559-604.

**Mendoza H, Campbell DG, Burness K, Hastie J, Ronkina N, Shim JH, Arthur JS, Davis RJ, Gaestel M, Johnson GL, Ghosh S and Cohen P.** (2008) Roles for TAB1 in regulating the IL-1-dependent phosphorylation of the TAB3 regulatory subunit and activity of the TAK1 complex. *Biochem J*, **409**, 711-722.

**Merika M, Williams AJ, Chen G, Collins T and Thanos D.** (1998) Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell*, **1**, 277-287.

**Messens J and Silver S.** (2006) Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *J Mol Biol*, **362**, 1-17.

**Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J and Bróne B.** (2003) Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell*, **14**, 3470-3481.

**Meyer EB and Wells WW.** (1999) Thioltransferase overexpression increases resistance of MCF-7 cells to adriamycin. *Free Radic Biol Med*, **26**, 770-776.

**Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M and Tschopp J.** (2004) RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol*, **5**, 503-507.

**Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R and Tschopp J.** (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, **437**, 1167-1172.



- Mieyal JJ, Gallogly MM, Qanungo S, Sabens SA and Shelton MD.** (2008) Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal*, **10**, 1941-1988.
- Mieyal JJ, Srinivasan U, Starke DW, Gravina SA and Mieyal PA.** (1995) Glutathionyl specificity of thioltransferases: mechanistic and physiological implications. *Biothiols in Health and Disease*, edited by Packer L. and Cadenas E. New York: Marcel Dekker, Inc., 305–372.
- Mieyal JJ, Starke DW, Gravina SA, Dothey C and Chung JS.** (1991a) Thioltransferase in human red blood cells: Purification and properties. *Biochemistry*, **30**, 6088–6097.
- Mieyal JJ, Starke DW, Gravina SA and Hocevar BA.** (1991b) Thioltransferase in human red blood cells: Kinetics and equilibrium. *Biochemistry*, **30**, 8883–8891.
- Miki J, Maeda M, Mukohata Y and Futai M.** (1998) The  $\gamma$ -subunit of ATP synthase from spinach chloroplasts Primary structure deduced from the cloned cDNA sequence. *FEBS Lett*, **232**, 221–226.
- Miranda-Vizuete A, Damdimopoulos AE and Spyrou G.** (1999) cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the mouse mitochondrial thioredoxin reductase gene(1). *Biochim Biophys Acta*, **1447**, 113-118.
- Miranda-Vizuete A, Damdimopoulos AE and Spyrou G.** (2000) The mitochondrial thioredoxin system. *Antioxid Redox Signal*, **2**, 801-810.
- Miranda-Vizuete A, Gustafsson J-A and Spyrou G.** (1998) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a human thioredoxin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **243**, 284-288.
- Miranda-Vizuete A, Lung J, Damdimopoulos AE, Gustafsson J-A, Oko RA, Pelto- Huikko M and Spyrou G.** (2001) Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *J Biol Chem*, **276**, 31567-31574.
- Miranda-Vizuete A, Sadek CM, Jimenez A, Krause WJ, Sutovsky P and Oko R.** (2004) The mammalian testis-specific thioredoxin system. *Antioxid Redox Signal*, **6**, 25-40.
- Mitcham JL, Parnet P, Bonnert TP, Garka KE, Gerhart MJ, Slack JL, Gayle MA, Dower SK and Sims JE.** (1996) T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin-1 receptor family. *J Biol Chem*, **271**, 5777–5783.
- Mittal CK and Murad F.** (1977) Activation of guanylate cyclase by superoxide-dismutase and hydroxyl radical—Physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 4360–4364.
- Mole DR, Maxwell PH, Pugh CW and Ratcliffe PJ.** (2001) Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life*, **52**, 43-47.
- Moos PJ, Edes K, Cassidy P, Massuda E and Fitzpatrick FA.** (2003) Electrophilic prostaglandins and lipid aldehydes repress redox-sensitive transcription factors p53 and hypoxia-inducible factor by impairing the selenoprotein thioredoxin reductase. *J Biol Chem*, **278**, 745-750.

**Moynagh PN.** (2005) TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol*, **26**, 469-476.

**Murata M, Ihara Y, Nakamura H, Yodoi J, Sumikawa K and Kondo N.** (2003) Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *J Biol Chem*, **278**, 50226-50233.

**Muzio M, Ni J, Feng P and Dixit VM.** (1997) IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*, **278**, 1612-1615.

**Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M and Miyake K.** (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol*, **3**, 667-672.

**Naito A, Azuma S, Tanaka S, Miyazaki T, Takaki S, Takatsu K, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Yamamoto T and Inoue J-I.** (1999) Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells*, **4**, 353-362.

**Nakamura H, Bai J, Nishinaka Y, Ueda S, Sasada J, Ohshio G, Imamura M, Takabayashi A, Yamaoka Y and Yodoi J.** Expression of thioredoxin and glutaredoxin, redox regulating proteins, in pancreatic cancer. *Cancer Detect Prev*, **24**, 53-60.

**Nakamura H, De Rosa SC, Yodoi J, Holmgren A, Ghezzi P and Herzenberg LA.** (2001a) Chronic elevation of plasma thioredoxin: inhibition of chemotaxis and curtailment of life expectancy in AIDS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2688-2693.

**Nakamura H, Herzenberg LA, Bai J, Araya S, Kondo N, Nishinaka Y and Yodoi J.** (2001b) Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 15143-15148.

**Nalvarte I, Damdimopoulos AE, Nystom C, Nordman T, Miranda-Vizuete A, Olsson JM, Eriksson L, Bjornstedt M, Arner, E. and Spyrou, G.** (2004a) Overexpression of enzymatically active human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in HEK-293 cells: effect on cell growth and differentiation. *J Biol Chem*, **279**, 54510-54517.

**Nalvarte I, Damdimopoulos AE and Spyrou G.** (2004b) Human mitochondrial thioredoxin reductase reduces cytochrome c and confers resistance to complex III inhibition. *Free Radic Biol Med*, **36**, 1270-1278.

**Nguyen H, Hiscott J and Pitha PM.** (1997) The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev*, **8**, 293-312.

**Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z and Matsumoto K.** (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, **1999**, 252-256.

**Nonn L, Williams RR, Erickson RP and Powis G.** (2003) The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol Cell Biol*, **23**, 916-922.

- Nordberg J and Arner ES.** (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, **31**, 1287-1312.
- Nordstrand K, Aslund F, Holmgren A, Otting G and Berndt KD.** (1999) NMR structure of Escherichia coli glutaredoxin 3–glutathione mixed disulfide complex: implications for the enzymatic mechanism. *J Mol Biol*, **286**, 541–552.
- Nordstrand, K., Sandstrom, A, Aslund, F, Holmgren, A, Otting, G, Berndt, KD.** (2000) NMR structure of oxidized glutaredoxin 3 from Escherichia coli. *J Mol Biol*, **303**, 423–432.
- Oganesyan G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A and Cheng G.** (2006) Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*, **439**, 208-211.
- O'Neill L.** (2000) The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem Soc Trans*, **28**, 557-562.
- O'Neill L.** (2002) Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily. *Curr Top Microbiol Immunol*, **270**, 47-61.
- O'Neill LA.** (2004) Immunology. After the toll rush. *Science*, **303**, 1481-1482.
- O'Neill LA.** (2008) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev*, **226**, 10-18.
- O'Neill LA and Dinarello CA.** (2000) The IL-1 receptor/Toll-like superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today*, **21**, 206-209.
- Ordureau A, Smith H, WindheimM, Peggie M, Carrick E, Morrice N and Cohen P.** (2008) The IRAK-catalysed activation of the E3 ligase function of Pellino isoforms induces the Lys63-linked polyubiquitination of IRAK1. *Biochem J*, **409**, 43-52.
- Oritani K, Medina KL, Tomiyama Y, Ishikawa J, Okajima Y, Ogawa M, Yokota T, Aoyama K, Takahashi I, Kincade PW and Matsuzawa Y.** (2000) Limitin: an interferon-like cytokine that preferentially influences B-lymphocyte precursors. *Nat Med*, **6**, 659–666.
- Osterlund PI, Pietila TE, Veckman V, Kotenko SV and Julkunen I.** (2007) IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J Immunol*, **179**, 3434-3442.
- Ow DW, Wet DE JR, Helinski DR, Howell SH, Wood KV and Deluca M.** (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science*, **234**, 856–859.
- Pan JL and Bardwell JCA.** (2006) The origami of thioredoxin-like folds. *Protein Sci*, **15**, 2217-2227.
- Pan S and Berk BC.** (2007) Glutathiolation regulates tumor necrosis factor-alpha-induced caspase-3 cleavage and apoptosis: key role for glutaredoxin in the death pathway. *Circ Res*, **100**, 213-219.

- Parekh AB and Penner R.** (1997) Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*, **77**, 901–930.
- Park YC, Burkitt V, Villa AR, Tong L and Wu H.** (1999) Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature*, **398**, 533-538.
- Park, Y.C., Burkitt, V., Villa, A.R., Tong, L. and Wu, H.** (1999) Structural basis for selfassociation and receptor recognition of human TRAF2. *Nature*, **398**, 533–538.
- Peltoniemi M, Kaarteenaho-Wiik R, Saily M, Sormunen R, Paakko P, Holmgren A, Soini Y and Kinnula VL.** (2004) Expression of glutaredoxin is highly cell specific in human lung and is decreased by transforming growth factor-beta in vitro and in interstitial lung diseases in vivo. *Hum Pathol*, **35**, 1000–1007.
- Peltoniemi MJ, Ryttil PH, Harju TH, Soini YM, Salmenkivi KM, Ruddock LW and Kinnula VL.** (2006) Modulation of glutaredoxin in the lung and sputum of cigarette smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, **7**, 133–144.
- Peng HB, Libby P and Liao JK.** (1995a) Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem*, **270**, 14214-14219.
- Peng HB, Rajavashisth TB, Libby P and Liao JK.** (1995b) Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, **270**, 17050-17055.
- Perry AK, Chen G, Zheng D, Tang H and Cheng G.** (2005) The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res*, **15**, 407-422.
- Pestka S, Krause CD and Walter MR.** (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, **202**, 8–32.
- Peters KL, Smith HL, Stark GR and Sen GC.** (2002) IRF-3-dependent, NFkappa B- and JNK-independent activation of the 561 and IFN-beta genes in response to double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6322–6327.
- Pham-Huy LA, He H and Pham-Huy C.** (2008) Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*, **4**, 89-96.
- Pimentel DR, Adachi T, Ido Y, Heibeck T, Jiang B, Lee Y, Melendez JA, Cohen RA and Colucci WS.** (2006) Strain-stimulated hypertrophy in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species-dependent Ras S-glutathiolation. *J Mol Cell Cardiol*, **41**, 613-622.
- Pineda-Molina E, Klatt P, Vazquez J, Marina A, Garcia de Lacoba M, Perez-Sala D and Lamas S.** (2001) Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry*, **40**, 14134-14142.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B.** (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, **282**, 2085-2088.

- Poole B.** (1975) Diffusion effects in the metabolism of hydrogen peroxide by rat liver peroxisomes. *J Theor Biol*, **51**, 149-167.
- Poole LB.** (2007) The catalytic mechanism of peroxiredoxins. *Subcell Biochem*, **44**, 61–81.
- Pulendran, B. and Ahmed, R.** (2006) Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell*, **124**, 849-863.
- Pullen SS, Miller HG, Everdeen DS, Dang TT, Crute JJ and Kehry MR.** (1998) CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry*, **37**, 11836-11845.
- Purdue PE and Lazarow PB.** (2001) Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 701-752.
- Qanungo S, Starke DW, Pai HV, Mieyal JJ and Nieminen AL.** (2007) Glutathione supplementation potentiates hypoxic apoptosis by S-glutathionylation of p65-NFkappaB. *J Biol Chem*, **282**, 18427-18436.
- Qian Y, Commane M, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K and Li X.** (2001) IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NF-kB. *J Biol Chem*, **276**, 41661-41667.
- Qin BY, Liu C, Lam SS, Srinath H, Delston R, Correia JJ, Derynck R and Lin K.** (2003) Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation. *Nat Struct Biol*, **10**, 913–921.
- Qin J, Jiang Z, Qian Y, Casanova JL and Li X.** (2004) IRAK4 kinase activity is redundant for interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase phosphorylation and IL-1 responsiveness. *J Biol Chem*, **279**, 26748–26753.
- Quan S, Schneider I, Pan J, Von Hacht A and Bardwell JC.** (2007) The CXXC motif is more than a redox rheostat. *J Biol Chem*, **282**, 28823-28833.
- Qureshi SA, Leung S, Kerr IM, Stark GR and Darnell JE Jr.** (1996) Function of Stat2 protein in transcriptional activation by alpha interferon. *Mol Cell Biol*, **16**, 288-293.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S and Medzhitov S.** (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, **118**, 229–241.
- Reddy PG, Bhuyan DK and Bhuyan KC** (1999) Lens-specific regulation of the thioredoxin-1 gene, but not thioredoxin-2, upon in vivo photochemical oxidative stress in the Emory mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, **265**, 345–349.
- Reich NC.** (2002) Nuclear/cytoplasmic localization of IRFs in response to viral infection or interferon stimulation. *J Interferon Cytokine Res*, **22**, 103–109.

**Reynaert NL, van der Vliet A, Guala AS, McGovern T, Hristova M, Pantano C, Heintz NH, Heim J, Ho YS, Matthews DE, Wouters EF and Janssen-Heininger YM.** (2006) Dynamic redox control of NF-kappaB through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory kappaB kinase beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13086-13091.

**Reynaert NL, Wouters FM and Janssen-Heininger YMW.** (2007) Modulation of Glutaredoxin-1 expression in a mouse model of allergic airway disease, *36* (2007) 147–151. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **36**, 147-151.

**Rigatto C and Singal PK.** (1999) Oxidative stress in uremia: impact on cardiac disease in dialysis patients. *Semin Dial*, **12**, 91-96.

**Riley PA.** (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*, **65**, 27-33.

**Rinna A, Torres M and Forman HJ.** (2006) Stimulation of the alveolar macrophage respiratory burst by ADP causes selective glutathionylation of protein tyrosine phosphatase 1B. *Free Radic Biol Med*, **41**, 86-91.

**Roberts RM, Ealy AD, Alexenko AP, Han CS and Ezashi T.** (1999) Trophoblast interferons. *Placenta*, **20**, 259–264.

**Roberts RM, Liu L, Guo Q, Leaman D and Bixby J.** (1998) The evolution of the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res*, **18**, 805–816.

**Robinson MJ, Stippec SA, Goldsmith E, White MA and Cobb MH.** (1998) A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation. *Curr Biol*, **8**, 1141–1150.

**Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA and Bazan JF.** (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 588-593.

**Rodriguez-Pascual F, Redondo-Horcajo M, Magan-Marchal N, Lagares D, Martinez-Ruiz A, Kleinert H and Lamas S.** (2008) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates endothelin-1 expression by a novel, redox-sensitive mechanism involving mRNA stability. *Mol Cell Biol*, **28**, 7139-7155.

**Rosen A, Lundman P, Carlsson M, Bhavani K, Srinivasa BR, Kjellstrom G, Nilsson K and Holmgren AA.** (1995) CD4+ T cell line-secreted factor, growth promoting for normal and leukemic B cells, identified as thioredoxin. *Int Immunol*, **7**, 625-633.

**Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM and Goeddel DV.** (1995) The TNFR2-TRAF signalling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*, **83**, 1243-1252.

**Rothe M, Wong SC, Henzel WJ and Goeddel DV.** (1994) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, **78**, 681-692.

**Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, M.B., Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S and Fitzgerald KA.** (2005) The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol*, **175**, 5260-5268.

**Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G and Karin M.** (1998) IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I $\kappa$ B kinase complex. *Nature*, **395**, 297-300.

**Rottenberg S, Schmuckli-Maurer J, Grimm S, Heussler VT and Dobbelaere DA.** (2002) Characterization of the bovine I $\kappa$ B kinases (IKK)alpha and IKKbeta, the regulatory subunit NEMO and their substrate I $\kappa$ Balpha. *Genes Cells*, **299**, 293-300.

**Rundlof AK, Carlsten M, Giacobini MM and Arner ES.** (2000) Prominent expression of the selenoprotein thioredoxin reductase in the medullary rays of the rat kidney and thioredoxin reductase mRNA variants differing at the 5' untranslated region. *Biochem J*, **347**, 661-668.

**Sachi Y, Hirota K, Masutani H, Toda K, Okamoto T, Takigawa M and Yodoi J.** (1995) Induction of ADF/TRX by oxidative stress in keratinocytes and lymphoid cells. *Immunol Lett*, **44**, 189-193.

**Sadek CM, Jimenez A, Damdimopoulos AE, Kieselbach T, Nord M, Gustafsson JA, Spyrou G, Davis EC, Oko R, van der Hoorn FA and Miranda-Vizuete A.** (2003) Characterization of human thioredoxin-like 2. A novel microtubule-binding thioredoxin expressed predominantly in the cilia of lung airway epithelium and spermatid manchette and axoneme. *J Biol Chem*, **278**, 13133-13142.

**Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, Oganessian G, Shahangian A, Zarnegar B, Shiba TL, Wang Y and Cheng G.** (2006) Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J*, **25**, 3257-3263.

**Sahlin L, Ostlund E, Wang H, Holmgren A and Fried G.** (2000a) Decreased expression of thioredoxin and glutaredoxin in placentae from pregnancies with pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Placenta*, **21**, 603-609.

**Sahlin L, Wang H, Stjernholm Y, Lundberg M, Ekman G, Holmgren A and Eriksson H.** (2000b) The expression of glutaredoxin is increased in the human cervix in term pregnancy and immediately post-partum, particularly after prostaglandin induced delivery. *Mol Hum Reprod*, **6**, 1147-1153.

**Sakurai A, Yuasa K, Shoji Y, Himeno S, Tsujimoto M, Kunimoto M, Imura N and Hara S.** (2004) Overexpression of thioredoxin reductase 1 regulates NF-kappa B activation. *J Cell Physiol*, **198**, 22-30.

**Salceda S and Caro J.** (1997) Hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. *J Biol Chem*, **272**, 22642-22647.

**Salmeen A and Barford D.** (2005) Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antiox Redox Signal*, **7**, 560–577.

**Sanchez G, Pedrozo Z, Domenech RJ, Hidalgo C and Donoso P.** (2005) Tachycardia increases NADPH oxidase activity and RyR2 S-glutathionylation in ventricular muscle. *J Mol Cell Cardiol*, **39**, 982-991.

**Sandalova T, Zhong L, Lindqvist Y, Holmgren A and Schneider G.** (2001) Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9533-9538.

**Sandau K and Brune B.** (1996) The dual role of S-nitrosoglutathione (GSNO) during thymocyte apoptosis. *Cell Signal*, **8**, 173-177.

**Sarkar R, Webb RC and Stanley JC.** (1995) Nitric oxide inhibition of endothelial cell mitogenesis and proliferation. *Surgery*, **118**, 274-279.

**Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T and Tanaka N.** (1998) Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett*, **441**, 106–110.

**Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N and Taniguchi T.** (2000) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- $\alpha$ / $\beta$  gene induction. *Immunity*, **13**, 539–548.

**Sato, M., Tanaka, N., Hata, N., Oda, E. and Taniguchi, T.** (1998) Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN- $\beta$  gene. *FEBS Lett*, **425**, 112-116.

**Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K and Akira S.** (2003) Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF- $\kappa$ B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*, **171**, 4304-4310.

**Schafer FQ and Buettner GR.** (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, **30**, 1191-1212.

**Schauvliege R, Janssens S and Beyaert R.** (2006) Pellino proteins are more than scaffold proteins in TLR/IL1-R signalling: a role as novel RING E3-ubiquitin-ligases. *FEBS Lett*, **580**, 4691-4702.

**Schauvliege R, Janssens S and Beyaert R.** (2007) Pellino proteins: novel players in TLR and IL-1R signalling. *J Cell Mol Med*, **11**, 453-461.

**Schreck R, Rieber P and Baeuerle PA.** (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.



- Schweizer U, Brauer AU, Kohrle J, Nitsch R and Savaskan NE.** (2004) Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Rev*, **45**, 164-178.
- Semenza GL.** (1999) Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 551-578.
- Semenza GL.** (2001) HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 167-171.
- Semenza GL.** (2002) Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*, **64**, 993-998.
- Semenza GL.** (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev, Cancer*, **3**, 721-732.
- Senger K, Merika M, Agalioti T, Yie J, Escalante CR, Chen G, Aggarwal AK and Thanos D.** (2000) Gene repression by coactivator repulsion. *Mol Cell*, **6**, 931-937.
- Seong SY and Matzinger.** (2004) Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol*, **4**, 469-478.
- Seth RB, Sun L and Chen ZJ.** (2006) Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res*, **16**, 141-147.
- Seth RB, Sun L, Ea CK and Chen ZJ.** (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF 3. *Cell*, **122**, 669-682.
- Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R and Hiscott J.** (2003) Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science*, **300**, 1148-1151.
- Sharp, P.A.** (2001) RNA interference. *Genes Dev*, **15**, 485-490.
- Shaulian, E. and Karin, M.** (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, **20**, 2390-2400.
- Shaw M, Cohen P and Alessi DR.** (1998) The activation of protein kinase B by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *Biochem J*, **336**, 241-246.
- Shelton MD, Chock PB and Mielay JJ.** (2005) Glutaredoxin: role in reversible protein S-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxid Redox Signal*, **7**, 348-366.
- Shelton MD and Mielay JJ.** (2008) Regulation by reversible S-glutathionylation: molecular targets implicated in inflammatory diseases. *Mol Cells*, **25**, 332-346.
- Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D and Klucher KM.** (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, **4**, 63-68.

**Shim JH, Xiao C, Paschal AE, Bailey ST, Rao P, Hayden MS, Lee KY, Bussey C, Steckel M, Tanaka N, Tanaka N, Yamada G, Akira S, Matsumoto K and Ghosh S.** (2005) TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev*, **19**, 2668-2681.

**Sies H.** (1993) Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat Res*, **299**, 183-191.

**Sies H and Menck CF.** (1992) Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res*, **275**, 367-375.

**Sies, H., Akerboom, TP.** (1984) Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues. *Methods Enzymol*, **105**, 445-451.

**Silberstein DS, McDonough S, Minkoff MS and Balcewicz-Sablinska MK.** (1993) Human eosinophil cytotoxicity enhancing factor. Eosinophil-stimulating and dithiol reductase activities of biosynthetic (recombinant) species with COOH-terminal deletions. *J Biol Chem*, **268**, 9138-9142.

**Silverman, N. and Maniatis, T.** (2001) NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev*, **15**, 2321-2342.

**Song JJ and Lee YJ.** (2003) Differential role of glutaredoxin and thioredoxin in metabolic oxidative stress-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Biochem J*, **373**, 853-854.

**Song JJ, Rhee JG, Suntharalingam M, Walsh SA, Spitz DR and Lee YJ.** (2002) Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem*, **277**, 46566-46575.

**Spyrou G, Enmark E, Miranda-Vizuete A and Gustafsson J.** (1997) Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J Biol Chem*, **272**, 2936-2941.

**Srinivasan U, Mieyal PA and Mieyal JJ.** (1997) pH profiles indicative of rate limiting nucleophilic displacement in thioltransferase (glutaredoxin) catalysis. *Biochemistry*, **36**, 3199-3206.

**Staal FJ, Roederer M and Herzenberg LA.** (1990) Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 9943-9947.

**Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, and Schreiber RD.** (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.

**Starke DW, Chock PB and Mieyal JJ.** (2003) Glutathione-thiyl radical scavenging and transferase properties of human glutaredoxin (thioltransferase). Potential role in redox signal transduction. *J Biol Chem*, **278**, 14607-14613.

**Strelow A, Kollwe C and Wesche H.** (2003) Characterization of Pellino-2, a substrate of IRAK1 and IRAK4. *FEBS Lett*, **547**, 157-161.

- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK and Lambeth JD.** (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature (London)*, **401**, 79-82.
- Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, Nakajima Y, Ishikawa H, Mitsuyoshi H, Sakamoto Y, Okanoue T, Kashima K, Nakamura H and Yodoi J.** (2000) Serum thioredoxin levels as an indicator of oxidative stress in patients with hepatitis C virus infection. *J Hepatol*, **33**, 616-622.
- Sun L, Deng L, Ea CK, Xia ZP and Chen ZJ.** (2004) The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell*, **14**, 289-301.
- Sun P, Enslin H, Myung P and Maurer RA.** (1994) Differential activation of CREB by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev*, **8**, 2527-2539.
- Sun QA, Kirnarsky L, Sherman S and Gladyshev VN.** (2001) Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3673-3678.
- Sun QA, Wu Y, Zappacosta F, Jeang KT, Lee BJ, Hatfield DL and Gladyshev VN.** (1999) Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J Biol Chem*, **274**, 24522-24530.
- Suzukawa K, Miura K, Mitsushita J, Resau J, Hirose K, Crystal R and Kamata T.** (2000) Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of rac1-regulated reactive oxygen species. *J Biol Chem*, **275**, 13175-13178.
- Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J and Matsumoto K.** (2000) TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell*, **5**, 649-658.
- Takagi Y, Nakamura T, Nishiyama A, Nozaki K, Tanaka T, Hashimoto N and Yodoi J.** (1999) Localization of glutaredoxin (thioltransferase) in the rat brain and possible functional implications during focal ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*, **258**, 390-394.
- Takahashi K, Kawai T, Kumar H, Sato S, Yonehara S and Akira S.** (2006) Roles of Caspase-8 and Caspase-10 in antiviral innate immune responses. *J Immunol*, **176**, 4520-4524.
- Takaoka A and Yanai H.** (2006) Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol*, **8**, 907-922.
- Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W. and Taniguchi, T.** (2005) Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, **434**, 243-249.
- 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.

**Takemoto Y, Yano H, Momosaki S, Ogasawara S, Nishida N, Kojiro S, Kamura T and Kojiro M.** (2004) Antiproliferative effects of interferon-alphaCon1 on ovarian clear cell adenocarcinoma in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, **10**, 7418-7426.

**Takeuchi M, Rothe M and Goeddel DV.** (1996) Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signalling proteins. *J Biol Chem*, **271**, 19935-19942.

**Tanaka T, Hosoi F, Yamaguchi-Iwai Y, Nakamura H, Masutani, H., Ueda, S., Nishiyama, A., Takeda S, Wada H, Spyrou G and Yodoi J.** (2002) Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *EMBO J*, **21**, 1695-1703.

**Tanaka Y, Naruse I, Maekawa T, Masuya H, Shiroishi T and Ishii S.** (1997) Abnormal skeletal patterning in embryos lacking a single Cbp allele: a partial similarity with Rubinstein-Taybi syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 10215-10220.

**Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A and Tanaka N.** (2001) IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*, **19**, 623-655.

**Taniguchi T, and Takaoka A.** (2002) The interferon- $\alpha/\beta$  system in antiviral

responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol*, **14**, 111-116.

**Taylor P, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin H, Brown G, and Gordon S.** (2005) Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*, **23**, 901-944.

**Thannickal VJ and Fanburg BL.** (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **279**, L1005-L1028.

**Thomas DD, Ridnour LA, Espey MG, Donzelli S, Ambs S, Hussain SP, Harris C C, Degraff W, Roberts DD, Mitchell JB and Wink DA.** (2006) Superoxide fluxes limit nitric oxide-induced signaling. *J Biol Chem*, **281**, 25984-25993.

**Thomas JA, Poland B and Honzatko R.** (1995) Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch Biochem Biophys*, **319**, 1-9.

**Thomassen E, Renshaw BR and Sims JE.** (1999) Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily. *Cytokine*, **11**, 389-399.

**Thornton JM.** (1981) Disulphide bridges in globular proteins. *J Mol Biol*, **151**, 261-287.

**Tolbert NE and Essner E.** (1981) Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *J Cell Biol*, **91**, 271s-283s.

**Toppo S, Vanin S, Bosello V and Tosatto SC.** (2008) Evolutionary and Structural Insights Into the Multifaceted Glutathione Peroxidase (Gpx) Superfamily. *Antioxid Redox Signal*, **10**, 1501-1514.

**Tuschl T.** (2001) RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBioChem*, **2**, 239-245.

- Ulevitch R, and Tobias P.** (1995) Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol*, **13**, 437-457.
- Underhill D, and Ozinsky A.** (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*, **20**, 825-852.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M and Telser J.** (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 44-84.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M and Mazur M.** (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, **160**, 1–40.
- Varsik P, Buranova D, Kollar B and Fedor-Freybergh PG.** (2006) Metabolic stroke in three years old boy as a consequence of metabolic derangement. A case report of recidiving Reye's-like syndrome. *Neuroendocrinol Lett*, **27**, 13-15.
- Varsik P, Buranova D, Kollar B, Kucera P, Kondas M and Sofko J.** (2005a) The quest of cavum septi pellucidi: obscure chance event discovery or the result of some encoded disturbance? Developmental cerebral dysplasias, cavum septi pellucidi and epilepsy: clinical, MRI and electrophysiological study. *Neuroendocrinol Lett*, **26**, 219-224.
- Varsik P, Buranova D, Kollar B, Traubner P, Bozek P and Mikulecky M.** (2005b) Familial occurrence of myoclonic epilepsy syndrome and acute intermittent porphyria. *Neuroendocrinol Lett*, **26**, 7-12.
- Velu CS, Niture SK, Doneanu CE, Pattabiraman N and Srivenugopal KS.** (2007) Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-binding domain during oxidative stress. *Biochemistry*, **46**, 7765-7780.
- Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D and Miyamoto S.** (1995) Rel/NF-kappa B/Ikappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev*, **9**, 2723–2735.
- Vilcek J.** (2003) Novel interferons. *Nat Immunol*, **4**, 8-9.
- Wajant H, Henkler F and Scheurich P.** (2001) The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal*, **13**, 389-400.
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J and Chen ZJ.** (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, **412**, 346-351.
- Wang D, Masutani H, Oka S, Tanaka T, Yamaguchi-Iwai Y, Nakamura H and Yodoi J.** (2006) Control of mitochondrial outer membrane permeabilization and Bcl-xL levels by thioredoxin 2 in DT40 cells. *J Biol Chem*, **281**, 7384-7391.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA and Semenza GL.** (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 5510–5514.

**Wang J, Boja ES, Tan W, Tekle E, Fales HM, English S, Mieyal JJ and Chock PB.** (2001) Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells. *J Biol Chem*, **276**, 47763-47766.

**Wang J, Pan S and Berk BC.** (2007) Glutaredoxin mediates Akt and eNOS activation by flow in a glutathione reductase-dependent manner. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 283-288.

**Wang J, Tekle E, Oubrahim H, Mieyal JJ, Stadtman ER and Chock PB.** (2003) Stable and controllable RNA interference: Investigating the physiological function of glutathionylated actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5103-5106.

**Wang W, Oliva C, Li G, Holmgren A, Lillig CH and Kirk KL.** (2005) Reversible silencing of CFTR chloride channels by glutathionylation. *J Gen Physiol*, **125**, 127-141.

**Wardman P and von Sonntag C.** (1995) Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells. *Methods Enzymol*, **251**, 31-45.

**Waterhouse PM, Wang MB and Lough T.** (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, **411**, 834-842.

**Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP and Kehrer JP.** (2004) Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol Sci*, **78**, 3-14.

**Weaver BK, Kumar KP and Reich NC.** (1998) Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1. *Mol Cell Biol*, **18**, 1359-1368.

**Weaver BK, Kumar KP and Reich NC.** (1998) Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1. *Mol Cell Biol*, **18**, 1359-1368.

**Weber F, Kochs G and Haller O.** (2004) Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol*, **17**, 498-515.

**Weg-Remers S, Ponta H, Herrlich P and Konig H.** (2002) Antagonistic signaling pathways regulate alternative splicing of CD44 in T cells. *Ann N Y Acad Sci*, **973**, 112-115.

**Wei SJ, Botero A, Hirota K, Bradbury CM, Markovina S, Laszlo A, Spitz DR, Goswami PC, Yodoi J and Gius D.** (2000) Thioredoxin nuclear translocation and interaction with redox factor-1 activates the activator protein-1 transcription factor in response to ionizing radiation. *Cancer Res*, **60**, 6688-6695.

**Weiss T, Papoutsaki M, Michel G, Reifenberger J, Chimenti S, Ruzicka T and Abts HF.** (2003) Molecular basis of basal cell carcinoma: analysis of differential gene expression by differential display PCR and expression array. *Int J Cancer*, **104**, 66-72.

- Wellman TL, Jenkins J, Penar PL, Tranmer B, Zahr R and Lounsbury KM.** (2004) Nitric oxide and reactive oxygen species exert opposing effects on the stability of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in explants of human pial arteries. *FASEB J*, **18**, 379–381.
- Wells WW, Xu DP, Yang YF and Rocque PA.** (1990) Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J Biol Chem*, **265**, 15361-15364.
- Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM and Powis G.** (2002) The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res*, **62**, 5089-5095.
- Wesche H, Gao X, Li X, Kirschning CJ, Stark GR and Cao Z.** (1999) IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem*, **274**, 19403-19410.
- Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S and Cao Z.** (1997) MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, **7**, 837–847.
- White J, Brou C, Wu J, Lutz Y, Moncollin V and Chambon P.** (1992) The acidic transcriptional activator GAL-VP16 acts on preformed template-committed complexes. *EMBO J*, **11**, 2229–2240.
- Whittwer CT, Herrmann MG, Moss AA and Rasmussen RP.** (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, **22**, 130-138.
- Williams CH, Arscott LD, Muller S, Lennon BW, Ludwig ML, Wang PF, Veine DM, Becker K and Schirmer RH.** (2000) Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur J Biochem*, **267**, 6110–6117.
- Williams CH Jr.** (1992) Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and mercuric ion reductase - a family of flavoenzyme transhydrogenases. In *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (Muller, F., ed.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA., 121-211.
- Windheim M, Stafford M, Peggie M and Cohen P.** (2008) Interleukin-1 (IL-1) induces the Lys63-linked polyubiquitination of IL-1 receptor-associated kinase 1 to facilitate NEMO binding and the activation of I $\kappa$ B kinase. *Mol Cell Biol*, **28**, 1783-1791.
- Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaja M, Hanafusa H and Choi Y.** (1999) TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell*, **4**, 1041-1049.
- Wood KV.** (1991) In: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status*, Stanley, P. and Kricka, L., eds., John Wiley and Sons, Chichester, NY, 11.
- Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J and Poole LB.** (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, **28**, 32-40.

**Xia L, Nordman T, Olsson JM, Damdimopoulos A, Bjorkhem-Bergman L, Nalvarte I, Eriksson LC, Arner ES, Spyrou G and Bjornstedt M.** (2003) The mammalian cytosolic selenoenzyme thioredoxin reductase reduces ubiquinone. A novel mechanism for defense against oxidative stress. *J Biol Chem*, **278**, 2141-2146.

**Xia TH, Bushweller JH, Sodano P, Billeter M, Bjornberg O, Holmgren A and Wuthrich K.** (1992) NMR structure of oxidized Escherichia coli glutaredoxin: comparison with reduced E. coli glutaredoxin and functionally related proteins. *Protein Sci*, **1**, 310–321.

**Xie Y, Kole S, Precht P, Pazin MJ and Bernier M.** (2009) S-glutathionylation impairs signal transducer and activator of transcription 3 activation and signalling. *Endocrinology*, **150**, 1122-1131.

**Xu LG, Li LY and Shu HB.** (2004) TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 17278-17282.

**Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z and Shu HB.** (2005) VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*, **19**, 727-740.

**Yamada Y, Nakamura H, Adachi T, Sannohe S, Oyamada H, Kayaba H, Yodoi J and Chihara J.** (2003) Elevated serum levels of thioredoxin in patients with acute exacerbation of asthma. *Immunol Lett*, **86**, 199-205.

**Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K and Akira S.** (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science*, **301**, 640-643.

**Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K and Akira S.** (2002) Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, **420**, 324-329.

**Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Kuwata H, Takeuchi O, Takeshige K, Saitoh T, Yamaoka S, Yamamoto N, Yamamoto S, Muta T, Takeda K and Akira S.** (2004) Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature*, **430**, 218-222.

**Yamamoto Y, Kim DW, Kwak YT, Prajapati S, Verma U and Gaynor RB.** (2001) IKKgamma/NEMO facilitates the recruitment of the IkappaB proteins into the IkappaB kinase complex. *J Biol Chem*, **276**, 36327–36336.

**Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ and Israel A.** (1998) Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell*, **93**, 1231–1240.

**Yamin TT and Miller DK.** (1997) The interleukin-1 receptor-associated kinase is degraded by proteasomes following its phosphorylation. *J Biol Chem*, **272**, 21540-21547.



**Yang Y, Jao S, Nanduri S, Starke DW, Mieyal JJ and Qin J.** (1998) Reactivity of the human thioltransferase (glutaredoxin) C7S, C25S, C78S, C82S mutant and NMR solution structure of its glutathionyl mixed disulfide intermediate reflect catalytic specificity. *Biochemistry*, **37**, 17145-17156.

**Ye H, Arron JR, Lamothe B, Cirilli M, Kobayashi T, Shevde NK, Segal D, Dzivenu OK, Vologodskaya M, Yim M, Du K, Singh S, Pike JW, Darnay BG, Choi Y and Wu H.** (2002) Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature*, **418**, 443-447.

**Yeldandi AV, Rao MS and Reddy JK.** (2000) Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutat Res*, **448**, 159-177.

**Ying J, Tong X, Pimentel DR, Weisbrod RM, Trucillo MP, Adachi T and Cohen RA.** (2007) Cysteine-674 of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase is required for the inhibition of cell migration by nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 783-790.

**Yoneda K, Chang MM, Chmiel K, Chen Y and Wu R.** (2003) Application of high-density DNA microarray to study smoke- and hydrogen peroxide-induced injury and repair in human bronchial epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*, **14**, 284-289.

**Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M Jr, Akira S, Yonehara S, Kato A and Fujita T.** (2005) Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*, **175**, 2851-2858.

**Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S and Fujita T.** (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*, **5**, 730-737.

**Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E and Fujita T.** (1998) Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J*, **17**, 1087-1095.

**Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E. and Fujita, T.** (1998) Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *Embo J*, **17**, 1087-1095.

**Yoshida R, Takaesu G, Yoshida H, Okamoto F, Yoshioka T, Choi Y, Akira S, Kawai T, Yoshimura A and Kobayashi T.** (2008) TRAF6 and MEKK1 play a pivotal role in the RIG-I-like helicase antiviral pathway. *J Biol Chem*, **283**, 36211-36220.

**Yoshitake S, Nanri H, Fernando MR and Minakami S.** (1994) Possible differences in the regenerative roles played by thioltransferase and thioredoxin for oxidatively damaged proteins. *J Biochem (Tokyo)*, **116**, 42-46.

**Young LD, Darryl Y, Bateman RM and Brock GB.** (2004) Oxidative stress and antioxidant therapy: their impact in diabetes-associated erectile dysfunction. *J Androl*, **25**, 830-836.

**Yu Y, Oko R and Miranda-Vizuete A.** (2002) Developmental expression of spermatid-specific thioredoxin-1 protein: transient association to the longitudinal columns of the fibrous sheath during sperm tail formation. *Biol Reprod*, **67**, 1546-1554.

**Zhang G and Ghosh S.** (2002) Negative regulation of Toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem*, **277**, 7059-7065.

**Zhang R, Al-Lamki R, Bai L, Streb JW, Miano JM, Bradley J and Min W.** (2004) Thioredoxin-2 inhibits mitochondria located ASK1-mediated apoptosis in a JNK-independent manner. *Circ Res*, **94**, 1438–1491.

**Zhang YZ, Gould KL, Dunbrack RL Jr, Cheng H, Roder H and Golemis EA.** (1999) The evolutionarily conserved Dim1 protein defines a novel branch of the thioredoxin fold superfamily. *Physiol Genomics*, **1**, 109–118.

**Zhong L, Arner ES and Holmgren A.** (2000) Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5854-5859.

**Zhong L, Arner ES, Ljung J, Aslund F and Holmgren A.** (1998) Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. *J Biol Chem*, **273**, 8581-8591.

**Zhou J, Damdimopoulos AE, Spyrou G and Brune B.** (2007) Thioredoxin 1 and thioredoxin 2 have opposed regulatory functions on hypoxia inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*, **280**, 7482–7490.