

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Uloga tioredoksina u adaptaciji stanice na oksidativni stres
The Role of Thioredoxin in Cell Adaptation to Oxidative Stress

SEMINARSKI RAD

Andrea Hloušek - Kasun
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2015.

Sadržaj

1. Uvod.....	2
2. Oksidativni stres.....	2
3. Slobodni radikali.....	4
3.1. Slobodni radikali kisika.....	4
3.2. Kisikovi reaktivni spojevi se generiraju tijekom oksidativne fosforilacije.....	6
3.3. Obrana mitohondrija od kisikovih reaktivnih spojeva.....	8
4. Tioredoksin.....	9
4.1. Tioredoksin sustav.....	9
4.2. Struktura tioredoksina i mehanizam reakcije.....	11
4.3. Različite uloge tioredoksina.....	13
4.4. Tioredoksin-reduktaza: struktura i mehanizam reakcije.....	15
4.5. Sličnosti i razlike između Trx i GSH/Grx sustava.....	16
5. Mete slobodnih radikala.....	17
5.1. Lipidi.....	17
5.2. DNA.....	18
5.3. Proteini.....	20
5.3.1. Oksidacija aminokiselina koje sadrže sumpor.....	21
5.3.2. Degradacija ireverzibilno osidiranih proteina.....	22
6. Sažetak.....	22
7. Summary.....	23
8. Literatura.....	24

1. Uvod

Danas je dobro poznato da kisikovi reaktivni spojevi (ROS - engl. *reactive oxygen species*) igraju važnu ulogu u modulaciji nekoliko fizioloških uloga i to uglavnom u signalnim putevima uključenim u upalne procese, staničnu proliferaciju, angiogenezu, apoptozu i starenje (Sies, 1993). S druge strane oksidativni stres je također zaslužan za mnoge nefiziološke promjene koje mogu biti smrtonosne za stanicu. Upravo zbog različitih uloga oksidativnog stresa, danas se sve više istražuju njegovi učinci. Oksidativni stres može nastati zbog vanjskih ili samih endogenih procesa u stanici, a u svrhu sprječavanja oksidativnih oštećenja makromolekula, stanice su razvile različite enzimske i neenzimske obrambene mehanizme (Koháryová i Kollárová, 2008). U stanicama su otkrivena dva glavna sustava odgovorna za održavanje unutarstaničnog reduciranog stanja i smanjivanje broja oksidativnih oštećenja: tioredoksin i glutation/glutaredoksin sustav. Tiorredoksin je mali, sveprisutan protein koji se nalazi u svim organizmima, a zahvaljujući svom niskom redoks potencijalu on je glavna stanična disulfidna reduktaza, koja sudjeluje u različitim fiziološkim procesima te djeluje kao antioksidans (Holmgren, 1985).

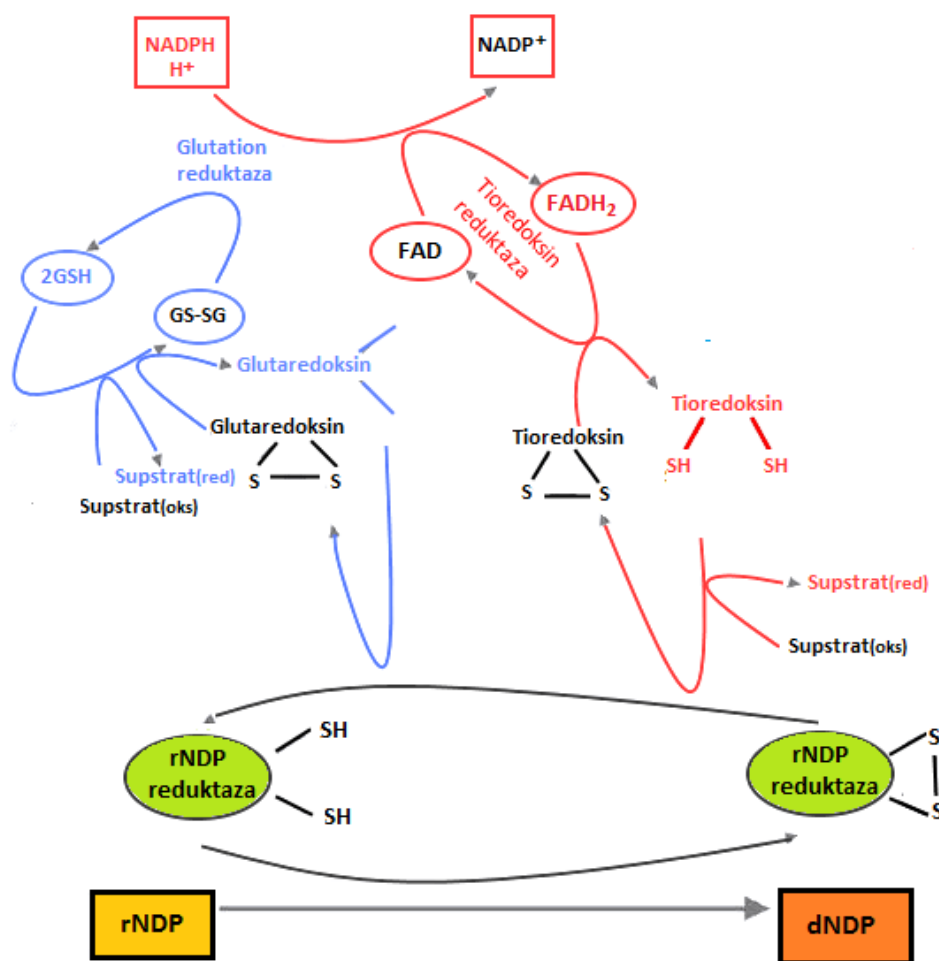
2. Oksidativni stres

Oksidativni stres zapravo predstavlja pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije, a nastaje ukoliko dođe do prevelike produkcije reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) zbog vanjskih utjecaja ili samih endogenih procesa u stanici. Primarni izvori endogenih kisikovih reaktivnih spojeva su: mitohondrij (oksidativna fosforilacija, transport elektrona), endoplazmatski retikulum, plazmatska membrana i peroksisomi, a nastaju različitim enzimskim reakcijama i/ili autooksidacijom molekula. Navedeni spojevi, također, mogu nastati kao posljedica egzogenih učinaka poput ionizirajućeg zračenja, infekcije patogenima (stimulirani makrofagi otpuštaju ROS kao mehanizam obrane protiv patogena), izlaganja herbicidima ili insekticidima (Ayala i sur. 2014).

Kako bi spriječile nastajanje oštećenja proteina, lipida, DNA i RNA djelovanjem oksidativnog stresa, stanice aktiviraju sustav enzimskih i neenzimskih obrambenih mehanizama koji uklanjaju kisikove reaktivne spojeve i popravljaju ili degradiraju oštećene molekule (Costa i sur. 2007).

U citoplazmi su identificirana dva glavna sustava za održavanje unutarstaničnog reduktivnog stanja: tioredoksin (Trx) i glutation/glutaredoksin (GSH/Grx) sustav (Holmgren, 1985). Pored toga što pružaju zaštitu tiolnim skupinama proteina od oksidacije u uvjetima oksidativnog stresa, ovi sustavi snabdjevaju elektonima enzime koji podliježu tiol-disulfidnoj izmjeni kao dijelu svog katalitičkog ciklusa. Tiorredoksin, koji sa tioredoksin-reduktazom i NADPH čini Trx

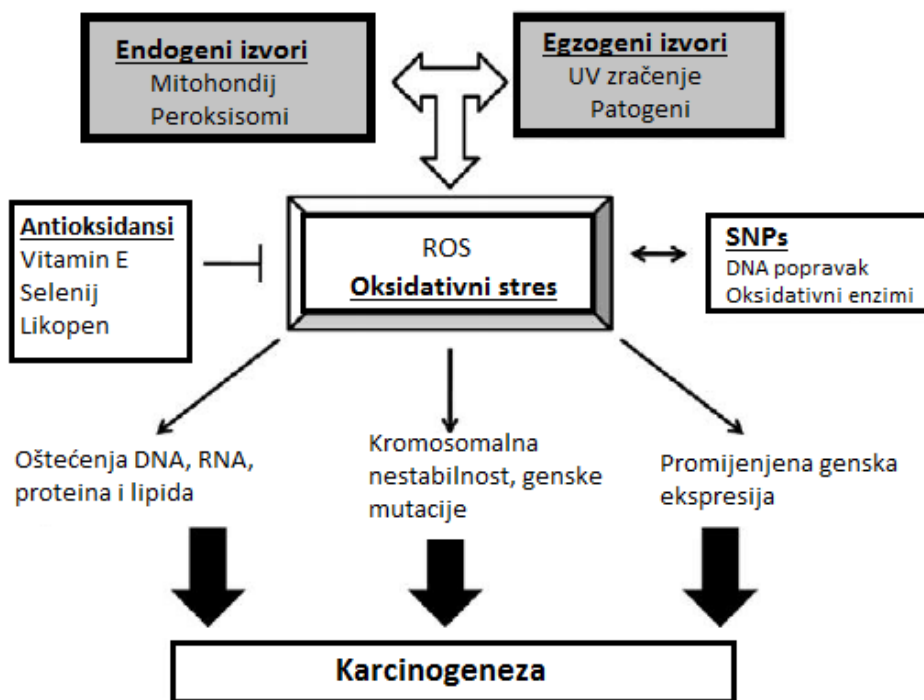
sustav, je glavna i sveprisutna disulfidna reduktaza odgovorna za održavanje citoplazmatskih proteina u reduciranom stanju. Karakterizacijom vijabilnih mutanata bakterije *Escherichia coli* koji nemaju tioredoksin, otkriven je drugi sustav GSH/Grx koji se sastoji od: glutationa (GSH), glutaredoksina (Grx), flavoproteina glutation-reduktaze (GSHR) i NADPH. Glutation je tripeptid koji se sastoji od: cisteina koji je amino grupom vezan za karboksilnu grupu glutamatnog bočnog ogranka gama peptidnom vezom i glicina, koji je normalnom peptidnom vezom vezan za cistein. GSH je glavni faktor GSH/Grx sustava zaslužan za niski redoks potencijal i visoku razinu slobodnih –SH skupina unutar stanice (Koháryová i Kollárová, 2008).



Slika 1: Shema tioredoksinog (Trx) i glutation/glutaredoksinog (GSH/Grx) sustava i njihova uloga u transkripciji. Oba sustava sudjeluju u održavanju reduciranog stanja unutar stanice sisavaca. Trx sustav sa supstratima za Trx, uključujući oksidirane proteine prikazan je desno, a GSH/Grx sustav lijevo (Koháryová i Kollárová, 2008).

Kisikovi reaktivni spojevi igraju važnu ulogu u modulaciji nekoliko fizioloških uloga i to uglavnom u signalnim putevima uključenima u upalne procese, staničnu proliferaciju, angiogenezu, apoptozu i starenje (Sies, 1993). Slobodni radikali kisika su također vrlo efektivni u borbi makrofaga protiv patogena. No, ukoliko se počnu abnormalno stvarati, na krivom mjestu i bez dostatnog obrambenog mehanizma, dolazi do poremećaja ravnoteže

između pro- i antioksidansa u prilog prooksidansa, tj. nastajanja oksidativnog stresa (Koháryová i Kollárová, 2008). Pojačani oksidativni stres smatra se uzrokom brojnih fizioloških promjena poput patomehanizama u neurodegenerativnim bolestima kao što su: Parkinsonova bolest, moždani udar i epilepsija (Schweizer i sur. 2004). Također, u novije vrijeme, smatra se jednim od glavnih induktora i modulatora postepenog procesa karcinogeneze, koji uključuje stvaranje i nakupljanje mutacija te selektivnu klonalnu ekspanziju mutiranih stanica (Klaunig i sur. 2010).



Slika 2: Kisikovi reaktivni spojevi (ROS) i njihova uloga u postupnom procesu karcinogeneze (Klaunig i sur. 2010).

Niska razina slobodnih radikala kisika može poslužiti kao signal koji ukazuje na nisku zalihu molekula kisika (hipoksiju) i tako služiti kao okidač koji pokreće metaboličke prilagodbe uvjetima niske razine kisika (Koháryová i Kollárová, 2008).

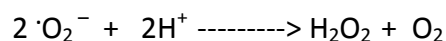
3. Slobodni radikali

3.1. Slobodni radikali kisika

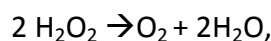
Slobodni radikali su kemijske vrste koje imaju nespareni elektron u vanjskoj ljusci. Sve slobodne radikale karakterizira iznimno visoka reaktivnost, što je rezultat njihova nastojanja da popune valentnu orbitalu, spare nespareni elektron i time postignu stabilnu elektronsku konfiguraciju.

Krajem 19. i početkom 20. stoljeća, nakon što su McCord i Fridovich otkrili prvi detoksicirajući enzim – superoksid dismutazu, započelo je vrijeme intenzivnog istraživanja slobodnih radikala i reaktivnih metabolita. Biokemijski najznačajnije reaktivne vrste su: slobodni radikali kisika, reaktivni neradikalni derivati kisika (vodikov peroksid) te reaktivni metaboliti izvedeni iz dušika (RNS – engl. *reactive nitrogen species*) u koje ubrajamo slobodne radikale dušika (dušikov(II) oksid, dušikov(IV) oksid) te spojeve i molekule kao peroksinitrit (ONOO^-) ili nitrozilni kation $[\text{N}=\text{O}]^+$. Proces nastajanja radikala u stanicama je neprekidan, slučajan, vezan uz normalne metaboličke reakcije (Koháryová i Kollárová, 2008). Tijekom mitohondrijskog oksidativnog metabolizma, većina se kisika reducira do vode, no procijenjeno je da se 4% do 5% pretvori u kisikove reaktivne spojeve, primarno superoksidni anion (O_2^-) (Klauning i sur. 2004).

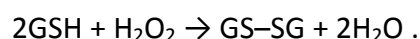
In vivo superoksidni radikal može nastati enzimskim i neenzimskim procesima. Za enzimsko nastajanje superoksidnog radikala odgovorna je NADPH-ovisna-oksidaza, locirana na staničnoj membrani polimorfonuklearnih stanica, makrofaga i endotelnih stanica i P_{450} -ovisna oksigenaza, a proteolitička konverzija ksantin-dehidrogenaze do ksantin-oksidaze je izvor superoksidnog aniona te vodikovog peroksida. Do neenzimske produkcije superoksidnog aniona dolazi kada se elektron prenese direktno na kisik s reduciranih koenzima ili prostetičkih skupina (npr. flavina ili željezno-sumpornih klastera). Mitohondrijski transportni lanac elektrona sadrži nekoliko redoks centara koji mogu prenijeti elektron direktno na kisik te tako izazvati nastanak oksidativnog stresa (Turrens, 2003). Superoksidni anion se smatra „primarnim“ radikalom kisika zato što njegovom daljnom interakcijom s molekulama, u stanici, mogu nastati „sekundarni“ radikali kisika. Primjerice, dismutacijom superoksidnog aniona djelovanjem superoksid dismutaze (SOD) nastaje vodikov peroksid i molekula kisika prema reakciji:



Vodikov peroksid, nastao ovom reakcijom, može se parcijalno reducirati do hidroksilnog slobodnog radikala Fentonovom reakcijom ili se u potpunosti reducirati do vode djelovanjem drugih enzima poput katalaze ili glutation-peroksidaze. Katalaza reducira vodikov peroksid do molekule vode prema reakciji:



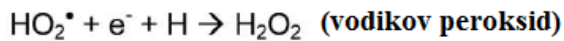
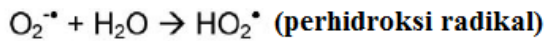
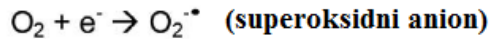
a glavna reakcija kojom selenoprotein glutation-peroksidaza katalizira redukciju vodikovog peroksida do vode glasi:



Mehanizam reakcije uključuje oksidaciju selenola selenocisteinskog bočnog ogranka vodikovim peroksidom. (GSH predstavlja reducirani monomerni glutation, a GS-SG glutation-disulfid).

Također, hidroksilni radikali i superoksidni radikali mogu dalje reagirati s drugim molekulama, čime nastaju različiti drugi slobodni radikali (Klaunig i sur. 2010).

Lančana reakcija nastajanja reaktivnih kisikovih metabolita:



3.2 Kisikovi reaktivni spojevi se generiraju tijekom oksidativne fosforilacije

Oksidativna fosforilacija je završni korak aerobne oksidativne razgradnje ugljikohidrata, masnih kiselina i aminokiselina u kojem energija oksidacije omogućuje sintezu ATP-a. Tijekom oksidativne fosforilacije elektroni se prenose s elektron donora (NADH i sukcinata) na molekularni kisik preko prenositelja elektrona koji se nalaze u unutrašnjoj membrani mitohondrija (Lehninger, 2013). Procijenjeno je da se prilikom mitohondrijskog oksidativnog metabolizma 4% do 5% kisika pretvori u reaktivne radikale kisika, primarno superoksidni anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Klaunig i sur. 2004). Standardni redukcijski potencijal konverzije molekularnog kisika do $\text{O}_2^{\cdot-}$ iznosi -0,16 V, a respiratorni lanac sadrži mnogo različitih redoks centara sa standardnim redukcijskim potencijalima između -0,32 V (NAD(P)H) i +0,39 V (citokrom α_3 u Kompleksu IV). S obzirom na visoko reduktivnu unutrašnjost mitohondrija, prijenos elektrona s različitih respiratornih komponenti na kisik je termodinamski povoljan (Turrens, 2003).

Mitohondrijski respiratorni lanac sastoji se od niza prenositelja elektrona koji su uglavnom integralni membranski proteini s prostetičkim skupinama sposobnim donirati jedan ili dva elektrona. Zajedno s NADH i FMN (FAD) u respiratornom lancu sudjeluju još tri tipa molekula koje prenose elektrone: ubikvinon, citokromi i proteini koji sadrže kompleks željeza i sumpora. Ti molekularni prenositelji elektrona organizirani su uglavnom u supramolekulske komplekse unutrašnje membrane mitohondrija.

Ubikvinon (Q) je hidrofobni prenositelj elektrona koji može slobodno difundirati kroz lipidni dvosloj unutrašnje membrane mitohondrija. On može prihvatiti jedan elektron (nastaje semikvinski radikal $\cdot\text{QH}$) ili dva elektrona (pri čemu nastaje potpuno reducirani ubikvinol QH_2) te tako služiti kao poveznica između donora dva elektrona i akceptora jednog elektrona. Postoje četiri supramolekulska proteinska kompleksa koji su dio lanca prenositelja elektrona u mitohondriju: Kompleks I (NADH dehidrogenaza), Kompleks II (sukcinat-dehidrogenaza), Kompleks III (citokrom bc_1 kompleks) i Kompleks IV (citokrom-oksidaza). Kompleks I i Kompleks II kataliziraju prijenos elektrona na ubikvinon s dva različita elektron donora NADH (Kompleks I) i sukcinata (Kompleks II). Kompleks III prenosi elektrone s reduciranog ubikvina na citokrom c, a Kompleks IV, u konačnici, prenosi elektrone s citokroma c na molekularni kisik (Lehninger, 2013). Prijenos elektrona s Kompleksa I i

Kompleksa II na ubikvinon (Q) i prijenos elektrona s ubikvinola (QH₂) na Kompleks III može dovesti do slučajnog prijenosa elektrona na molekularni kisik i nastajanje superoksidnog aniona ($\cdot\text{O}_2^-$) i vodikovog peroksida (H₂O₂). Smatra da su glavni izvori superoksidnog aniona, koji nastaje na Kompleksu I, semikinonski radikal ($\cdot\text{QH}$) koji nastaje kao intermedijer i jedan od željezo-sumpornih kastera. Oboje mogu, s malom vjerojatnosti, prenijeti elektron na kisik i tako stvoriti superoksidni anion. Kompleks II sadrži prostetičku skupinu hem b koji, čini se, nije direktno uključen u put prijenosa elektrona sa sukcinata do ubikvinona stoga se smatra da će, ukoliko dođe do slučajnog prijenosa elektrona na hem b, on predati taj elektron molekularnom kisiku. Primarni izvor superoksidnog aniona u slučaju Kompleksa III je semikinonski radikal ($\cdot\text{QH}$) koji nastaje na Kompleksu III tijekom Q-ciklusa. Autooksidacijom semikinonskog radikala na unutrašnjoj ili vanjskoj strani unutarnje membrane mitohondrija može nastati superoksidni anion (Turrens, 2003).

Do povećane formacije ROS-a dolazi kada mitohondriji ne proizvode ATP zbog premalo ADP-a ili O₂, a postoji i visoki omjer NADH/NAD⁺ u matriksu mitohondrija. U ovakvim situacijama mitohondrij je pod oksidativnim stresom jer je više elektrona dostupno za ulazak u respiratorni lanac nego što ih je preneseno na finalni akceptor. Kada je količina elektron donora (NADH) izjednačena s količinom elektron akceptora (O₂) oksidativni stres je manji te je proizvodnja ROS-a svedena na minimum (Lehninger, 2013).

Superoksidni anion formiran u matriksu uklanja se obrambenim sustavom mitohondrija, dok se $\cdot\text{O}_2^-$ nastao u međumembranskom prostoru može prenijeti u citoplazmu anionskim kanalima, koji ovise o membranskom potencijalu i tamo eliminirati. Produkcija ukupnog $\cdot\text{O}_2^-$ razlikuje se od organa do organa i ovisi o respiratornoj aktivnosti mitohondrija (Turrens, 2003).

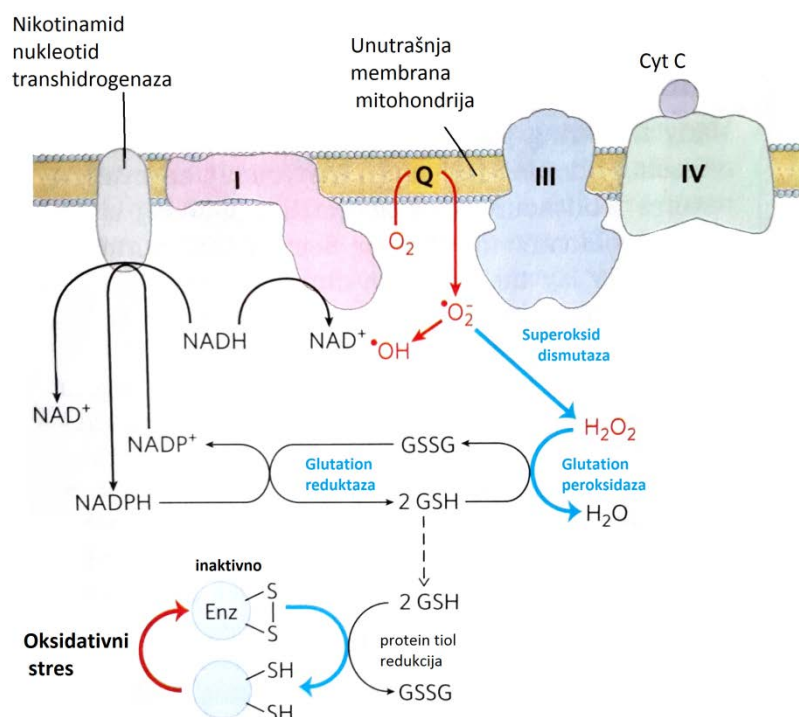
Tablica 1: Lokalizacija nastajanja superoksidnog aniona na supramolekulskim proteinskim kompleksima respiratornog lanca (Turrens, 2003).

Kompleks	Lokalizacija
Kompleks I (NADH dehidrogenaza)	Unutrašnja strana unutrašnje membrane mitohondrija
Kompleks II (sukcinat-dehidrogenaza)	Unutrašnja strana unutrašnje membrane mitohondrija
Kompleks III (citokrom bc ₁ kompleks)	Unutrašnja strana unutrašnje membrane mitohondrija
Kompleks III (citokrom bc ₁ kompleks)	Vanjska strana unutrašnje membrane mitohondrija

3.3. Obrana mitohondrija od kisikovih reaktivnih spojeva

U svrhu sprječavanja nastanka oštećenja makromolekula reaktivnim kisikovim spojevima, mitohondrij posjeduje vlastiti tioredoksinski i glutation/glutaredoksinski sustav. Također, matriks mitohondrija sadrži specifičnu formu superoksid-dismutaze (MnSOD), s manganom u aktivnom mjestu koji eliminira superoksidne radikale formirane u matriksu ili na unutrašnjoj strani unutrašnje membrane mitohondrija. Ekspresija MnSOD inducirana je agensima koji uzrokuju oksidativni stres, uključujući zračenje i hipoksiju, u procesu koji je posredovan oksidativnom aktivacijom nuklearnog transkripcijskog faktora NFκB. Sami međumembranski prostor mitohondrija sadrži drugi izozim SOD koji sadrži bakar i cink u svojem aktivnom mjestu (CuZnSOD) umjesto mangana. Vodikov peroksid nastao dismutacijom superoksidnog aniona superoksid-dismutazom, uglavnom se reducira u potpunosti do vode uz pomoć glutation-peroksidaze.

Unutrašnja mitohondrijska membrana, također, sadrži i vitamin E, moćni antioksidans, koji štiti mitohondrij od lančane reakcije nastanka slobodnih radikala. Uz navedene obrambene mehanizme protiv nastanka kisikovih reaktivnih spojeva, važno je napomenuti da mitohondrij također sadrži i niz DNA-popravljajućih mehanizama koji omogućuju popravak pogrešaka nastalih djelovanjem ROS-a. To je od iznimne važnosti jer mtDNA sadrži gene za nekoliko važnih proteina uključujući i podjedinice NADH dehidrogenaze i citokrom-oksidge i citokroma b (Turrens, 2003).



Slika 3: Stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva u matriksu mitohondrija i mitohondrijska obrana protiv oksidativnih oštećenja. Ukoliko je više elektrona dostupno za ulazak u respiratorni lanac nego što ih je preneseno respiratornim lancem dolazi do povišene

produkcije superoksidnog radikala ($\cdot\text{O}_2^-$). Reakcije prikazane plavom bojom prikazuju jedan tip obrane mitohondrija od djelovanja superoksidnog aninona. Reducirani glutation (GSH) donira elektron za redukciju vodikovog peroksida i oksidiranih Cys bočnih ogranaka (-S-S-) enzima i drugih proteina. GSH se regenerira iz oksidirane forme (GSSG), redukcijom, uz pomoć NADPH (Lehninger, 2013).

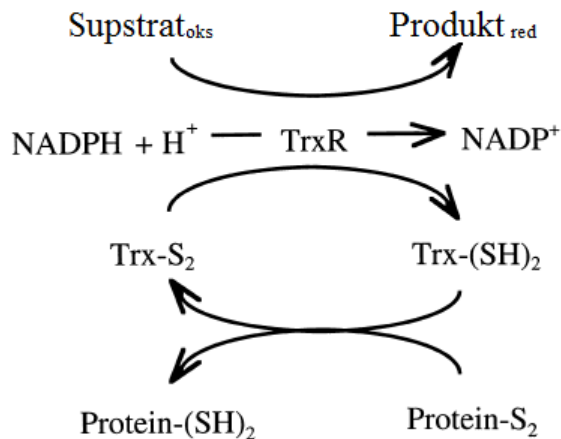
4. Tioredoksin

4.1. Tioredoksin sustav

Tioredoksin sustav sastoji se od: tioredoksina (Trx), NADPH i flavoproteina tioredoksin-reduktaze (TrxR). Tioredoksin-reduktaza je specifični dimerni flavoprotein s redoks-aktivnim mjestom (disulfid/ditiol) veličine 70kDa u bakterija, gljiva i biljaka. Tioredoksin-reduktaze u viših eukariota nešto su veći dimerni flavoproteini (112-130 kDa), njihova katalitička aktivnost ovisna je o selenu, te za razliku od TrxR u nižih eukariota imaju više supstrata. Svi izozimi TrxR u sisavaca sadrže C-terminalni produžetak koji posjeduje očuvani slijed Gly-Cys-SeCys-Gly (Arnér i Holmgren, 2000).

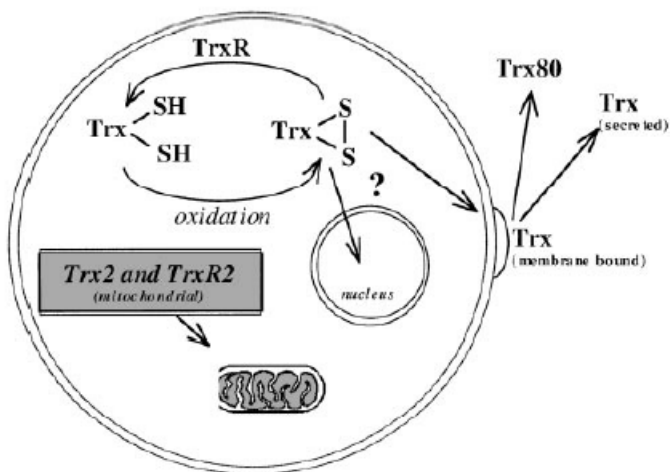
Tioredoksin je mali ($M_r \sim 12,000$) sveprisutan protein zastupljen u svim prokariotskim i eukariotskim vrstama. Do danas je najbolje okarakteriziran tioredoksin iz *E. coli* koji se sastoji od 108 aminokiselinskih bočnih ogranaka (Koháryová i Kollárová, 2008). Posjeduje veliki broj poznatih te, pretpostavlja se, još mnogo neistraženih funkcija. Sa svojim ditiolnim/disulfidnim aktivnim mjestom ima ulogu glavne stanične disulfidne reduktaze (Arnér i Holmgren, 2000). Njegova osnovna, očuvana uloga, je uloga donora vodika različitim reduktivnim proteinima, kao što je i ribonukletid-reduktaza, kojoj u procesu sinteze DNA donira vodik u reakciji redukcije D-riboze, u ribonukleotid difosfatu, do 2'-deoksi-D-riboze (Lehninger, 2013). Izoforme tioredoksina prisutne su u većini organizama, a može biti lokaliziran u citoplazmi, membrani, mitohondrijima, kloroplastima (u biljaka) te u izvanstaničnom prostoru (Koháryová i Kollárová, 2008).

Biljke posjeduju kloroplastni tioredoksin koji s ferodoksin/tioredoksin-reduktazom regulira fotosintetske enzime ovisno o prisutnosti svjetla (Arnér i Holmgren, 2000).

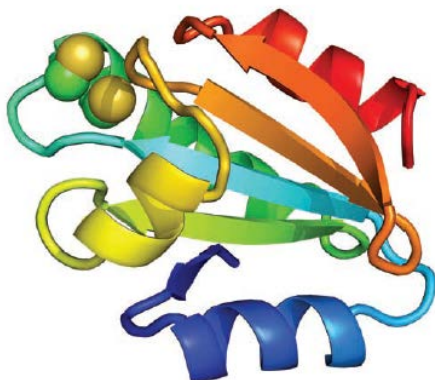


Slika 4: Shema oksido-reduktazne aktivnosti tioredoksin sustava. Prikazana je redukcija disulfida u aktivnom mjestu osidiranog tioredoksina (TrxS_2) do tiola u reduciranoj formi tioredoksina (Trx-(SH)_2) uz pomoć tioredoksin-reduktaze (TrxR) i NADPH . Trx-(SH)_2 reducira disulfide ciljnih proteina oksidoreduktivnom aktivnosti pri čemu nastaje TrxS_2 (Arnér i Holmgren, 2000).

U sisavaca su identificirane dvije forme tioredoksina i jedna posebna „skraćena“ forma. Citosolni/nuklearni Trx1 i mitohondrijski Trx2 su dvije izoforme kodirane dvama različitim genima (Arnér i Holmgren, 2000). Trx1 i Trx2 su dio takozvanih citosolnih i mitohondrijskih Trx sustava zajedno s citosolnim i mitohondrijskim NADPH ovisnim tioredoksin-reduktazama. Na površini monocitnih stanica nalazi se „skraćena“ forma tioredoksina Trx80 koja sadrži 80 aminokiselinskih bočnih ogranaka. Trx80 ne posjeduje posljednjih 20-24 C-terminalnih aminokiselinskih bočnih ogranaka (Koháryová i Kollárová, 2008). Citosolni tioredoksin u sisavaca ima brojne uloge poput zaštite od oksidativnog stresa, regulaciji apoptoze te regulaciji aktivnosti različitih transkripcijskih faktora. Kodiran je genom TXN , a mutacija u samo jednoj kopiji tog gena je letalna te dovodi do smrti četverostaničnog embrija (Arnér i Holmgren, 2000). U slučaju Trx2 gena, istraživanja pokazuju da do smrti embrija dolazi ukoliko su mutirana oba gena (Koháryová i Kollárová, 2008).



Slika 5: Kompartimentalizacija tioredoksin sustava u stanici sisavaca. Shematski je prikazana lokalizacija tioredoksina (Trx) i tioredoksinske reduktaze (TrxR) u različitim staničnim odjeljcima, specifične izoenzime u mitohondriju (Trx2 i TrxR2) te izoenzim vezan za membranu kao i ekstracelularne izoforme (Trx i Trx80). Sam prijenos tioredoksina još uvijek nije poznat, ali količina jezgrine i ekstracelularne forme raste s povećanjem oksidativnog stresa, zbog čega se pretpostavlja da se translociraju iz citosola (Arnér i Holmgren, 2000).



Slika 6: Struktura humanog tioredoksina u reduciranom stanju dobivena rendgenskom kristalografijom. Polipeptidni lanac koji se sastoji od 105 aminokiselina prikazan je u obliku vrpce, N-kraj prikazan je plavom, a C-kraj crvenom bojom. Bočni lanci redoks-aktivnog mjesta, Cys32 i Cys35, prikazani su kuglama (C zeleno, S žuto) (Voet, 2010).

4.2. Struktura tioredoksina i mehanizam reakcije

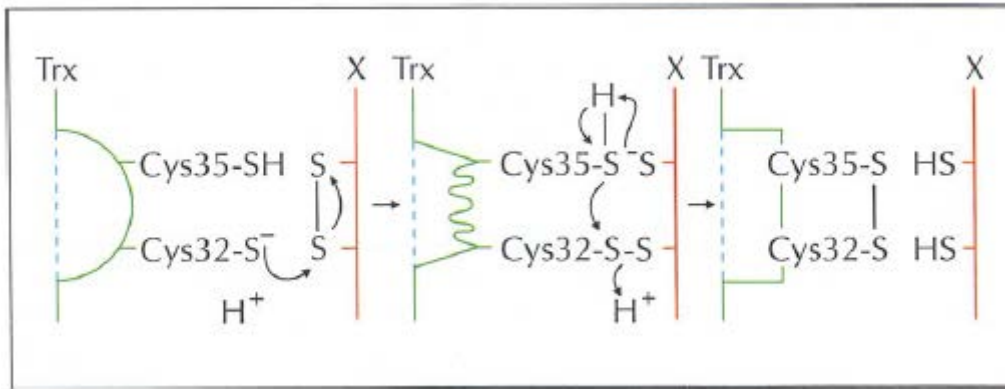
Unatoč različitim funkcijama koje obnaša tioredoksin, od Arheja do sisavaca ima 27% - 69% očuvanu primarnu strukturu s tioredoksinom Trx1 iz *E. coli* te gotovo u potpunosti očuvanu 3D strukturu, što je posljedica karakterističnog sklapanja proteina. Ova činjenica ukazuje na mogućnost da su svi tipovi tioredoksina evoluirali iz zajedničkog pretka (Martin, 1995).

3D struktura se sastoji od srži građene od 5 paralelnih β -nabranih ploča okruženih s 4 α -zavojnice. Disulfidno aktivno mjesto smješteno je na izbočenju na C-kraju smještenom na dnu β nabrane ploče (β_2) nakon čega slijedi dugi α -heliks (α_2). Aktivno mjesto čini očuvan slijed: Cys32-Gly-Pro-Cys35 (Holmgren, 1995). Uz očuvane bočne ogranke koji grade aktivno mjesto postoji, još nekoliko, visoko očuvanih aminokselina blizu aktivnog mjesta: Asp26, Ala29, Trp31, Asp61, Pro76 (u cis konfiguraciji) te Gly92 (korištene su oznake prema *E. Coli*) (Arnér i Holmgren, 2000). Visoka očuvanost aktivnog mjesta i područja oko samog aktivnog mjesta proizlazi iz činjenice da je tioredoksin supstrat za dva enzima TrxR i ribonukleotid-reduktazu; prema tome njegovo aktivno središte mora biti kompatibilno s oba aktivna središta ovih enzima kako bi pravilno stupili u interakciju (Koháryová i Kollárová, 2008).

Sama razlika u strukturi između oksidiranog i reduciranog oblika tioredoksina jako je mala i uključuje lokalnu konformacijsku promjenu u disulfidnom aktivnom mjestu (Cys32 i Cys35) i oko samog aktivnog mjesta. Ipak, razlika je dostatna da omogući interakciju s ispravnim redoks oblikom supstrata. Ciljni protein s disulfidnom vezom dobro će se vezati na reduciranu formu tioredoksina (Trx-(SH)₂), ali se neće moći vezati na oksidiranu formu (Trx-S₂) (Holmgren, 1995).

Pretpostavka je da se mehanizam reakcije odvija tako da se prvotno, reducirana forma, tioredoksina sa hidrofobnim područjem u aktivnom mjestu veže supstrat time tvoreći kompleks. Zatim, u hidrofobnoj okolini kompleksa tiolat Cys32, djelujući kao nukleofil, napada supstrat tvoreći miješano disulfidno prijelazno stanje. U konačnici, napad sada deprotoniranog tiolata Cys35, na disulfid dovodi do formacije ditiola u ciljnom proteinu i disulfida u aktivnom mjestu tioredoksina. Do konformacijskih promjena dolazi tijekom vezanja između tioredoksina i ciljnog proteina, te u koracima prijenosa elektrona (Holmgren, 1995).

Neobična je, naime, niska pK_a vrijednost Cys32 (6,3) koja omogućuje nastajanje tiolatnog aniona u uvučenom, hidrofobnom aktivnom mjestu tioredoksina, budući da bi u takvom okruženju pK_a trebao rasti. Uzrok niske pK_a vrijednosti je upravo parcijalno pozitivni naboj α -zavojnice (α_2) koji stabilizira negativni naboj tiolatnog aniona u aktivnom mjestu. Naime, Cys32 bočni ogranak nalazi se na kraju β_2 -nabrane ploče, a Cys35 na početku α_2 -zavojnice, sama amidna veza Cys35 ne sudjeluje u nikakvim vodikovim vezama koje stabiliziraju α_2 -zavojnicu već je usmjerena prema tiolatnom anionu Cys32 stabilizirajući ga (Forman-Kay i sur. 1992).



Slika 7: Predloženi mehanizam reakcije tioredoksin katalizirane redukcije ciljnog proteina koji sadrži disulfid. Reducirani tioredoksin ($\text{Trx}-(\text{SH})_2$) veže se na ciljni protein (X) svojim hidrofobnim područjem aktivnog mjesta. Nukleofilni napad tiolata Cys32 rezultira formacijom mješanog disulfidnog prijelaznog stanja, nakon kojeg slijedi nukleofilni napad deprotoniranog Cys35 čime nastaje $\text{Trx}-\text{S}_2$ i reducirani ciljni protein (Holmgren, 1995).

4.3. Različite uloge tioredoksina

Različite fiziološke funkcije tioredoksina u različitim tipovima organizama evoluirale su od zajedničke osnovne reakcije do velikog broja različitih specijaliziranih funkcija. To uključuje njegovu osnovnu, konzerviranu ulogu donora vodika za različite reduktivne enzime koju dijeli s glutaredoksinom, pa sve do specijalizirane funkcije u DNA replikaciji faga T7 gdje djeluje kao strukturna komponenta drugog enzima tvoreći kompleks T7 DNA polimeraze (Arnér i Holmgren, 2000). Jedna od ranije otkrivenih uloga je sudjelovanje tioredoksina zajedno s ferodoksinom u svjetlosnoj regulaciji kloroplastnih enzima uključenih u proces fotosinteze. U biljaka tioredoksin regulira cijeli niz funkcija od fotosinteze do rasta, cvjetanja i razvoja sjemenki. Generalna oksidoreduktivna aktivnost tioredoksina ima dvije važne uloge: (1) kao nosač elektrona potreban je za katalitičke cikluse biosintetskih enzima poput ribonukleotid-reduktaze, metionin-sulfoksid-reduktaze i sulfat-reduktaze; i (2) generalna zaštita citosolnih proteina od agregacije ili inaktivacije oksidativnom formacijom intra- ili inter- molekulskih disulfidnih veza (Arnér i Holmgren, 2000).

Također, istraživanja ukazuju na to da mnogi transkripcijski faktori bivaju regulirani tioredoksinom koji ima važnu ulogu u njihovoj aktivaciji ili inaktivaciji redukcijom. Tioredoksin je primjerice krucijalan za redoks regulaciju transkripcijskog faktora $\text{NF-}\kappa\text{B}$ koji sadrži cisteinske bočne ogranke i regulira ekspresiju brojnih upalnih gena (Hayashi i *sur.* 1993). Redukcijom cisteinskih bočnih ogranaka povećava se DNA vezujuća aktivnost, što omogućuje ekspresiju ciljanih gena (Toledano i Leonard, 1991).

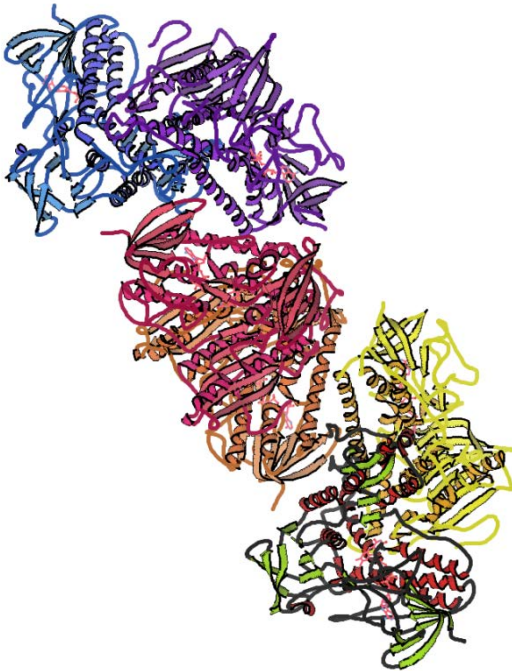
Ektracelularni tioredoksin također posjeduje imunomodulatorna svojstva. Iz stanice se izlučuje još nepoznatim mehanizmom, a pokazano je da mnoge normalne i neoplastične stanice izlučuju tioredoksin u uvjetima oksidativnog stresa i upalnih procesa (Arnér i Holmgren, 2000). Još jedna iznimno važna uloga tioredoksina je u staničnoj signalizaciji te obrani od oksidativnih oštećenja i oksidativnog stresa doniranjem elektrona tioredoksin-peroksidazi ili peroksiredoksinima koji kataliziraju redukciju štetnog vodikovog peroksida (Kang i sur. 1998). Premda glutathion-peroksidaza i katalaza također reduciraju vodikov peroksid pokazano je da barem jedna nadeksprimirana izoforma tioredoksin-peroksidaza može unutar stanice inhibirati indukciju apoptoze smanjujući razinu vodikovog peroksida i time sudjelovati u samoj regulaciji apoptoze (Zhang i sur. 1997).

Tablica 2: Uloge tioredoksina u različitim organizmima (Arnér i Holmgren, 2000).

Organizam	Uloga tioredoksina
Svi organizmi (?)	Sinteza DNA Disulfidna redukcija proteina
Mnogi organizmi	Redukcija H ₂ O ₂ Popravlak proteina uz pomoć redukcije metionin sulfoksida
Fagi E.Coli (T7, f1, M13)	Podjedinica T7 DNA polimeraze Sudjelovanje u slaganju filamentoznih faga
Bakterije i kvasci	Donor vodika za 3'-fosfoadenilsulfat (PAPS) reduktazu
Biljke	Regulacija kloroplastnih fotosintetskih enzima Cvjetanje Stvaranje sjemenki
Sisavci	Redoks regulacija transkripcijskih faktora (NFκB, AP-1) Regulacija apoptoze Imunomodulacija Trudnoća CNS

4.4. Tiodredoksin-reduktaza: struktura i mehanizam reakcije

Tiodredoksin-reduktaza (TrxR) je član nukleotid-disulfid oksidoreduktazne obitelji proteina koja uključuje i glutation -reduktazu (GSHR), lipoamid dehidrogenazu i reduktazu ovisnu o ionu žive. Članovi ove obitelji su homodimerni flavoproteini koji sadrže jedan redoks-aktivni disulfid i jedan čvrsto vezan FAD po podjedinici, te NADPH veznu domenu. TrxR sisavaca vrlo je različita od dobo proučavane TrxR *E. coli*. Za razliku od TrxR *E. coli* koja sadrži podjedinice veličine 35 kDa, TrxR sisavaca sadrži podjedinice veličine 55 kDa i puno širu supstratnu specifičnost. TrxR sisavaca može reducirati Trx različitih vrsta te različite druge nedisulfidne supstrate poput selenita i lipidnog hidroperoksida. Također, za razliku od TrxR *E. coli*, TrxR sisavaca sadrži C-terminalni periferni redoks-centar koji interagira s centralnim redoks-aktivnim mjestom.

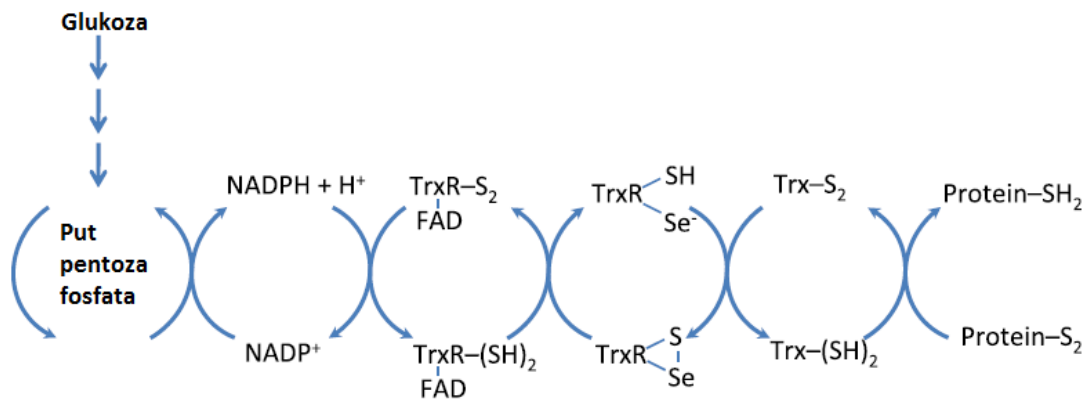


Slika 8: Kristalna struktura tiodredoksin reduktaze 1 čovjeka (RCSB, PDB).

Na nivou primarne strukture, TrxR iz čovjeka, pokazuje veću sličnost s GSHR čovjeka nego s TrxR *E. coli*. Svi izozimi tiodredoksin reduktaze u sisavaca homologni su glutation reduktazi te u aktivnom mjestu sadrže očuvani zajednički motiv: -Cys⁵⁹-Val-Asn-Val-Gly-Cys⁶⁴-.

Sve TrxR kod sisavaca sadrže ekstenziju od 16 aminokiselina na C-kraju s karakterističnim motivom Gly-Cys-SeCys-Gly. Selenocisteinski bočni ogranak je esencijalan za katalitičku aktivnost TrxR. Uklanjanje SeCys karboksipeptidaznom digestijom dovodi do inaktivacije

TrxR. Uloga očuvanog SeCys bočnog ogranka je produživanje transportnog lanaca elektrona od katalitičkog disulfida do površine enzima gdje može predati elektron tioredoksinu (Holmgren i Lu, 2010).



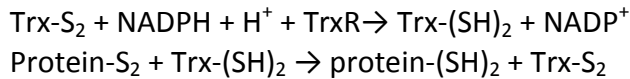
Slika 9: Predloženi mehanizam redukcije Trx uz pomoć TrxR sisavaca. Izvor elektrona za tioredoksin sustav je NADPH, koji se u najvećoj mjeri proizvodi putem pentoza fosfata. Elektron se prenosi sa NADPH na FAD, zatim do N-terminalnog redoks-aktivnog disulfida u jednoj od podjedinica TrxR, te u konačnici do C-terminalnog aktivnog mjesta Gly-Cys-SeCys-Gly druge podjedinice koja zatim predaje elektron tioredoksinu (Holmgren i Lu, 2010).

4.5. Sličnosti i razlike između Trx i GSH/Grx sustava

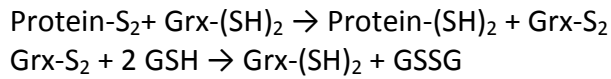
Ovi sustavi su identificirani zajedno u brojnim organizmima i oba sustava igraju izrazito važnu ulogu u zaštiti staničnih makromolekula od oštećenja slobodnim radikalima kisika. Zajednička obilježja ovih sustava je da posjeduju: (1) reduktazni enzim (TrxR, GSHR); (2) mali redoks-aktivni peptid (Trx i Grx) i (3) posjedovanje sposobnosti tiol/disulfidne izmjene. Trx je prvi puta otkriven kao elektron donor za ribonukleotid-reduktazu, a kasnije je utvrđeno da istu ulogu posjeduje i Grx. Uz ovu funkciju poznata je i njihova uloga donora elektrona 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat-reduktazi (PAPS) u putu asimilacije sulfata kao i metioninsulfoksid (Met-SO) reduktazi u *E.coli*. Iako ta dva sustava imaju zajedničku ulogu održavanja redoks homeostaze u stanici do sad nije otkrivena funkcionalna interakcija između ta dva sustava. Jedino je poznato da Trx može reducirati oksidirani GSH (Koháryová i Kollárová, 2008).

Razlika između ova dva sustava je u tome što: (1) GSHR ima ograničenu supstratnu specifičnost i reducira samo GSH i (2) visoka unutarstanična razina reduciranog GSH, koji reducira elektrofile spontano i GSH-transferaznim katalitičkim mehanizmom. U stanicama sisavaca TrxR posjeduje širi raspon supstrata te reducira ne samo Trx već i nedisulfidne supstrate. S druge strane, Grx ima sposobnost kataliziranja reakcija i monotioličnim mehanizmom, za razliku od Trx koji katalizira reakcije samo ditioličnim mehanizmom.

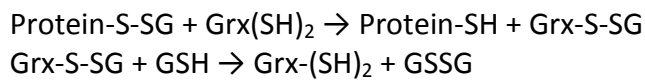
Ditiolni mehanizam Trx sustava:



Ditiolni mehanizam GSH/Grx sustava:



Monotiolni mehanizam GSH/Grx sustava:

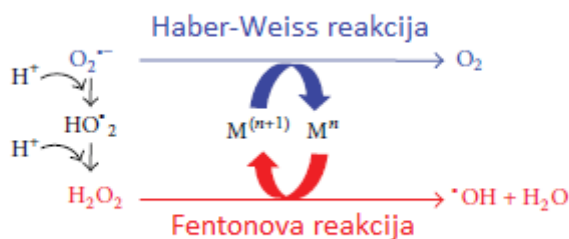


GSSG je oksidirani GSH, protein-S-SG je miješani disulfid sa GSH (Koháryová i Kollárová, 2008).

5. Mete slobodnih radikala

5.1. Lipidi

Glavne mete kisikovih reaktivnih spojeva su DNA, RNA, proteini i lipidi. U slučaju lipida slobodni radikali mogu napasti direktno polinezasićene masne kiseline (PUFA) stanične membrane te tako inicirati lipidnu peroksidaciju tj. oksidativnu degradaciju lipida. Glikolipidi, fosfolipidi i kolesterol također su mete slobodnih kisikovih radikala, njihovim oštećenjem nastaju letalne modifikacije i promjene u fluidnosti membrane. Najsnažniji učinak na lipide imaju hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$) i perhidroksi radikal ($\cdot\text{O}_2\text{H}$). Hidroksilni radikal je izrazito mobilni i kemijski najreaktivniji oblik slobodnih kisikovih radikala, a nastaje Fentonovom ili Haber-Weissovom reakcijom prikazanom na Slici 10.

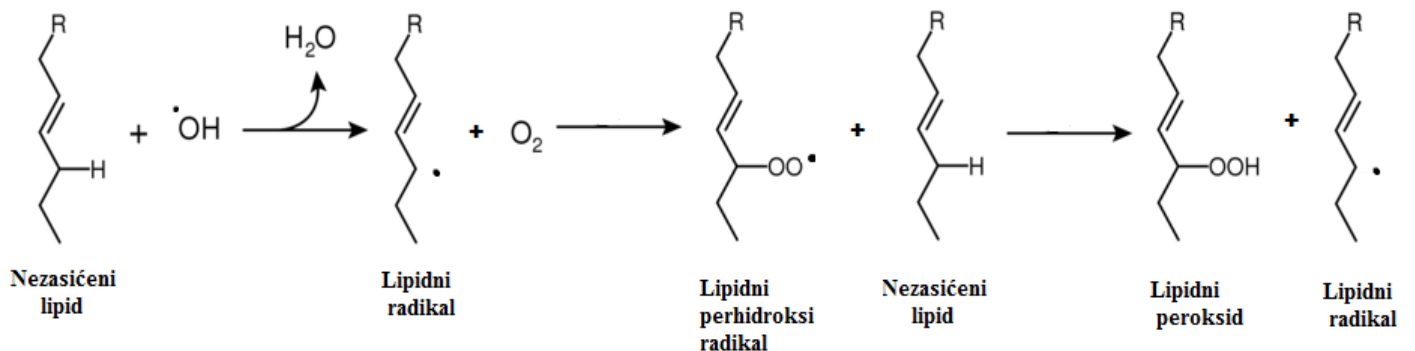


Slika 10: Shema Fentonove i Haber-Weiss reakcije. Reducirana forma prijelaznih metala (M^n) reagira s vodikovim preoksidom što dovodi do nastajanja hidroksilnih radikala ($\cdot\text{OH}$) Fentonovom reakcijom. Superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) također može reagirati sa oksidiranom formom prijelaznih metala ($\text{M}^{(n+1)}$) te producirati M^n koji ponovno ulazi u redoks ciklus Haber-Weiss reakcijom (Ayala i sur. 2014).

Perhidroksi radikal ($\cdot\text{O}_2\text{H}$) također igra važnu ulogu u lipidnoj peroksidaciji. To je protonirana forma superoksida koja daje vodikov peroksid, koji u reakciji sa željezom ili bakrom, daje hidroksilni radikal Fentonovom ili Haber-Weiss reakcijom (Ayala i sur. 2014).

Proces lipidne peroksidacije napreduje lančanom reakcijom slobodnih radikala (Slika 11). Naime, njime dolazi do stvaranja sve većeg broja slobodnih radikala koji potom djeluju na sve više polinezasićenih masnih kiselina koje se u konačnici razgrađuju do različitih produkata. Najopasniji produkti su reaktivni, aldehidni produkti, koji uzrokuju oštećenja različitih makromolekula, najčešće proteina (Humphries and Sweda, 1998). Za razliku od slobodnih radikala, aldehidi su stabilne molekule, zbog čega posjeduju sposobnost difundiranja i napadanja drugih, udaljenijih, makromolekula (Koháryová i Kollárová, 2008).

Primarni efekt lipidne peroksidacije je promjena fluidnosti membrane što direktno utječe na svojstva membrane i transmembranske proteine kao i na proteine vezane za staničnu membranu (Ayala i sur. 2014).

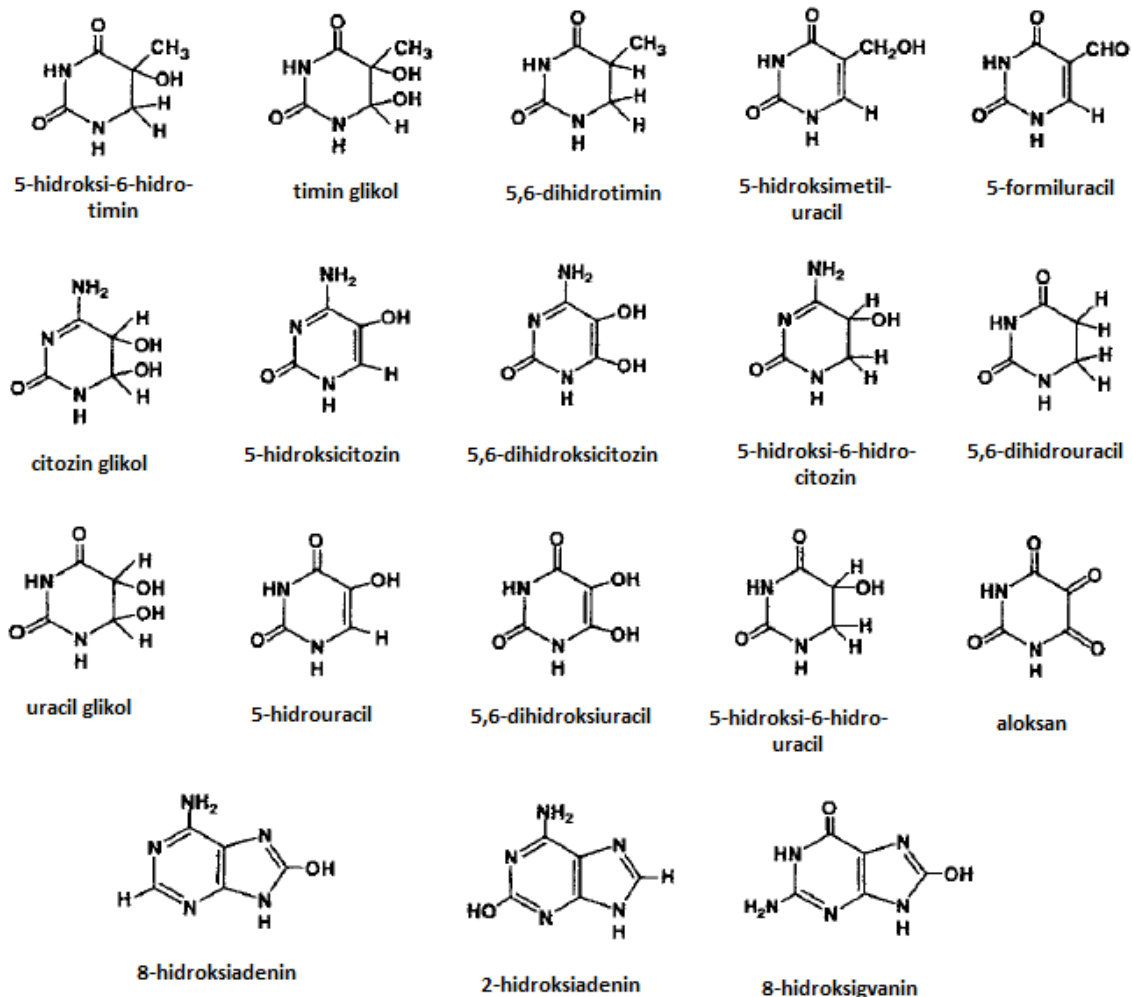


Slika 11: Predloženi mehanizam lipidne peroksidacije. Proces napreduje lančanom reakcijom slobodnih radikala (Ayala i sur. 2014).

5.2 DNA

Oksidativna oštećenja DNA glavni su izvor nakupljanja mutacija u živim organizmima. Procijenjena frekvencija oksidativnih DNA oštećenja u ljudskoj stanici po danu iznosi 10^4 lezija. ROS koji izaziva najviše DNA oštećenja je hidroksilni radikal. Njegov prekursor, vodikov peroksid, manje je reaktivan, no više difuzabilan, zbog čega ima sposobnost stvaranja hidroksilnih radikala, na mjestima udaljenijim od njegovog nastanka, Fentonovom ili Haber-Weiss reakcijom. Slobodni radikali mogu napasti N-glikozidnu vezu između baze i šećera (čime nastaju apurinska ili apirimidinska mjesta), fosfodietersku vezu (čime nastaju jednolančni ili dvolančani lomovi) ili pak uzrokovati nastajanje ukriženih DNA veza. Ukoliko se takva oštećenja ne poprave prije replikacije DNA, može doći do stanične smrti, nastanka mutacija ili genomske nestabilnosti. Reaktivni kisikovi radikali mogu izazvati cijeli spektar

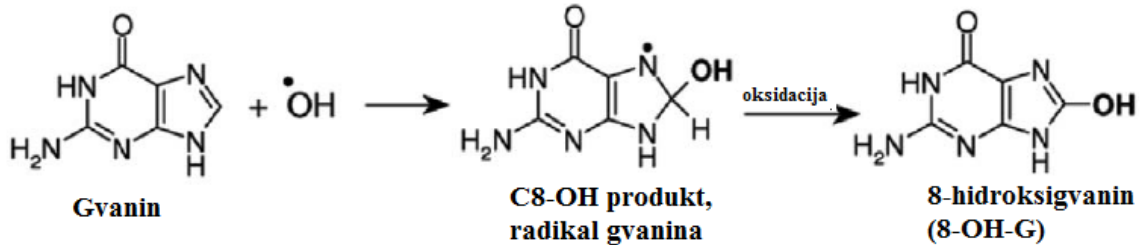
oštećenja koja uključuju više od 20 poznatih produkata, uključujući oštećenja sve četiri baze i timin-tirozin ukriženu veza (Dizdaroglu, 1992).



Slika 12: DNA bazni produkti nastali inerakcijom s kisikovim reaktivnim spojevima (Cooke i sur. 2003).

Najproučavanije i najzastupljenije oksidativno oštećenje DNA je nastali 8-hidroksideoksi gvanozin (8-OHdG), koji je mutagen u bakterijskim stanicama i stanicama sisavaca. Istraživanja su pokazala da je razina 8-OHdG povišena u različitim tipovima raka u ljudi i u animalnim modelima tumora. 8-OHdG se u svojoj stabilnoj syn konformaciji može spariti s citozinom i adeninom. Ukoliko se pogrešno sparivanje ne popravi, dolazi do pojave transverzije $G/C \rightarrow T/A$ koja dovodi do mutacije. Takve transverzije česte su u mutiranim onkogenima i tumor-supresorskim genima. Tijekom replikacije DNA, kisikovi reaktivni spojevi također mogu reagirati sa dGTP-om te stvoriti 8-OHdG koji se potom može ugraditi nasuprot dC ili dA lanca kalupa, čime dolazi do $A/T \rightarrow C/G$ transverzije. Upravo zbog velike učestalosti

nastajanja, 8-OHdG služi kao biomarker za mjerenje oksidativnog oštećenja DNA te procjenu jačine oksidativnog stresa (Klaunig i sur. 2010).



Slika 13: Formacija 8-OHdG djelovanjem hidroksilnog radikala (Klaunig i sur. 2010).

5.3. Proteini

Proteini su kao najzastupljenije makromolekule također podložni oksidativnim modifikacijama. Oksidacija proteina uključuje: oksidaciju sulfhidrilne grupe (najčešća proteinska modifikacija), oksidacija aminokiselinskih bočnih ograna, reakcija s aldehydima nastalim lipidnom peroksidacijom te modifikacija prostetičke grupe ili metalnog klastera.

Oksidacija može okrnjiti proteinsku funkciju. Naime, zbog promjena koje dovode do odmotavanja proteina povećava se njegova hidrofobnost, što često uzrokuje stvaranje toksičnih agregata.

U prisutnosti kisikovih reaktivnih spojeva proteini se mogu oštetiti direktno, oksidacijom aminokiselinskih bočnih ograna i kofaktora ili sekundarno djelovanjem krajnjih produkata lipidne peroksidacije. U slučaju proteinskih kofaktora, oksidacijom 4Fe-4S klastera enzima poput mitohondrijske akonitaze nastaju oštećenja, koja dovode do gubitka aktivnosti čime se u konačnici smanjuje ukupna respiratorna aktivnost. Nadalje, oslobođeno željezo potiče formaciju visoko reaktivnih hidroksilnih radikala (već spomenutom Fentonovom reakcijom) koji potom stvaraju još veća molekularna oštećenja. Ukoliko se oksidira aminokiselinski bočni ogranak blizu aktivnog mjesta dolazi do konformacijske promjene koja za sobom povlači smanjenu proteinsku aktivnost. Aminokiseline sklone oksidaciji su: triptofan, tirozin, lizin, arginin i prolin, dok su histidin, cistein i metionin su izrazito podložni oksidaciji. Promjene koje uzrokuju odmotavanje proteina najčešće mijenjaju njihovu hidrofobnost i uzrokuju nastajanje toksičnih proteinskih agregata (Costa i sur. 2007).

Oksidativni stres također može dovesti do nastanka karbonilne grupe, oksidacijom specifičnih aminokiselina poput: lizina, arginina prolina i histidina ili pak cijepanjem

proteinske okosnice kod prolinskih, glutamatnih i aspartatnih bočnih ogranaka. Proteinska karbonilacija je ireverzibilna i u koleraciji sa staničnom smrću induciranom oksidativnim stresom (Costa i sur. 2007).

Tioredoxin sustav, kao glavna stanična disulfidna reduktaza može direktno ili indirektno poslužiti kao donor elektrona oksidiranim proteinima te tako sprječiti promjene u hidrofobnosti i stvaranje toksičnih agregata (Koháryová i Kollárová, 2008).

5.3.1. Oksidacija aminokiselina koje sadrže sumpor

Redoks stanje proteinskih tiola ovisno je o staničnoj lokalizaciji. Kompartimentalizacija je izrazito važna prilikom formacije disulfidnih veza upravo zbog zaštite stanice od nespecifičnih oksidacijskih ili redukcijskih događaja. Disulfidne veze su esencijalne za smatanje i stabilnost proteina koji se izlučuju iz stanice. Također, disulfidne veze su važne u uspostavi kvaterne strukture proteina, tj. u formaciji homo- ili hetero- multimeričkih. Upravo je zbog tih razloga iznimno važno zaštititi proteinske disulfidne veze od napada slobodnih radikala (Costa i sur. 2007).

U eukariotskoj stanici disulfidne veze se formiraju u lumenu endoplazmatskog retikuluma reakcijom koju katalizira disulfid-izomeraza, dok se u bakterija disulfidne veze formiraju u periplazmi (Raina i Missiakas, 1997). Neželjena formacija disulfidne veze u citoplazmi naziva se „disulfidnim stresom“ (Åslund i Blackwith, 1999). Proteini u izvanstaničnom prostoru i na površini stanice bogati su stabilizirajućim disulfidnim vezama, odražavajući tako oksidirano stanje izvanstaničnog prostora (Koháryová i Kollárová, 2008). Zbog izrazito reducirajuće okoline, formacija stabilne disulfidne veze u stanici je izrazito rijetka.

Aminokiseline koje sadrže sumpor, metionin i cistein, imaju ulogu antioksidanasa te su izrazito važni u regulaciji staničnog metabolizma. Bočni ogranak metionina oksidira se do metionin-S-sulfoksida (Met-S-SO) i metionin-R-sulfoksida (Met-R-SO). Metionin-sulfoksid-reduktaza reducira nastali metionin sulfoksid do metionina čime sprječava ireverzibilnu oksidaciju metioninskih bočnih ogranaka slobodnim radikalima kisika do sulfonskih derivata (Met-SO₂). Predložena je ideja da se oksidacijom površinski izloženih metionina zapravo štite ostali bočni ogranci od oksidativnih oštećenja. Oksidacijom proteinskih cistidinski tiolnih grupa (-SH) može doći do nastanka: tiolnog radikala (-S[•]), disulfidne veze (-S-S-), kao i sulfeničnog (-SOH), sulfiničnog (SO₂H) i sulfoničnog (-SO₃H) kiselinskog derivata. Do nedavno se smatralo da je nastajanje cisteinske sulfonične i sulfinične kiseline ireverzibilan proces, no novija istraživanja ukazuju na postojanje specifičnih proteina koji mogu prevesti te produkte do manje štetnih, i time smanjiti proteinska oštećenja (Costa i sur. 2007).

5.3.2. Degradacija ireverzibilno oksidiranih proteina

Proteini koji su ireverzibilno inaktivirani nastajanjem metioninskih sulfona, cisteinske sulfinične ili sulfonične kiseline i karbonilnih derivata ne mogu se više popraviti, stoga ih stanica mora prepoznati i degradirati staničnim proteolitičkim procesima. Ukoliko stanica ne ukloni oštećene proteine može doći do njihove daljnje oksidacije i agregacije.

Takvi proteinski agregati iznimno su toksični i obično dovode do nastanka bolesti ili starenja (Petropoulos i Friguet, 2005). Njihovo nakupljanje je posljedica smanjene sinteze ATP-a i povećane formacije ROS-a ili inhibicije proteasoma čime se smanjuje degradacija oksidiranih proteina i dalje se promoviraju stanična oštećenja. Upravo iz tih razloga, selektivna degradacija oksidiranih proteina iznimno je važna za održavanje stanične homeostaze (Costa i sur. 2007).

Proteasomi su multikatalitički proteazni kompleksi koji igraju izrazito važnu ulogu u degradaciji neželjenih proteina, bilo da su normalni, oštećeni, mutirani ili krivo smotani. Degradacija neželjenih proteina sprječava njihovo nakupljanje i agregaciju te ujedno omogućuje recikliranje aminokiselina. 20S i 26S proteasomi odgovorni su za degradaciju različitih abnormalnih staničnih proteina u eukariotskim stanicama. Novija istraživanja ukazuju na to da je ATP- i ubikvitin-neovisna proteoliza katalizirana 20S proteasomom odgovorna za degradaciju oksidiranih proteina, dok ATP-stimulirani i ubikvitin-ovisni 26S proteasom ne sudjeluje u degradaciji oksidiranih proteina upravo zbog njegove visoke osjetljivosti na uvjete oksidativnog stresa. Također, uočeno je da stanice izložene oksidativnom stresu, kao i one koje se oporavljaju od oksidativnog stresa, imaju jaču ekspresiju gena koji kodiraju za 20S proteasom (Costa i sur. 2007).

U stanicama sisavaca se pod utjecajem oksidativnog stresa aktivira šaperon-posredovani put koji omogućuje učinkovito uklanjanje oštećenih citosolnih proteina putem lizosoma. Hsp70 obitelj šaperona prepoznaje oksidirane proteine i posreduje pri njihovoj translokaciji u lizosome, gdje će se dogoditi njihova proteoliza (Kiffin i sur. 2004).

Mitochondriji također sadrže proteolitički sustav koji je odgovoran za uklanjanje krivo smotanih ili oštećenih proteina. U stanicama sisavaca, ATP-ovisna mitohondrijska Lon proteaza je izrazito važna za degradaciju oksidativno modificiranih proteina (Bulteau i sur. 2006).

6. Sažetak

Oksidativni stres predstavlja pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije, a nastaje ukoliko dođe do prevelike produkcije slobodnih kisikovih radikala. Slobodni kisikovi radikali mogu nastati pod utjecajem vanjskih ili unutarnjih čimbenika, a najčešće su produkt mitohondrijskog oksidativnog metabolizma. Oksidativni stres može izazvati teška oštećenja različitih makromolekula, te tako dovesti do stanične smrti. U svrhu sprječavanja oksidativnih oštećenja makromolekula, stanice su

razvile različite obrambene mehanizme od kojih su najvažnija dva sustava: tioredoksin i glutathion/glutaredoksin sustav.

Tioredoksin sustav koji se sastoji od: tioredoksina, tioredoksin-reduktaze i NADPH, je zastupljen u svim organizmima od Arheja do čovjeka. Različite fiziološke funkcije tioredoksina u različitim tipovima organizama evoluirale su od zajedničke osnovne reakcije do velikog broja različitih specijaliziranih funkcija. Njegova osnovna, očuvana uloga je uloga donora vodika za različite reduktivne enzime. Tioredoksin štiti stanicu uništavajući reaktivne kisikove radikale putem različitih direktnih i indirektnih mehanizama. Još uvijek nisu otkrivene sve uloge tioredoksina kao ni svi enzimi i sustavi koji s njim ulaze u interakciju u svrhu smanjenja oksidativnog stresa.

7. Summary

Oxidative stress reflects an imbalance between cell oxido-reductive reactions in favour of oxidation. It is a result of uncontrolled production of reactive oxygen species. The creation of free radicals can be initiated by exogenous or endogenous factors. Mainly, they are product of mitochondrial oxidative metabolism. Oxidative stress can induce severe macromolecular damage which can be deleterious for the cell. Two molecular systems responsible for protecting cellular macromolecules from damage induced by ROS and electrophilic species, were identified together in many organisms: thioredoxin and glutathione/glutaredoxin system.

The thioredoxin system comprises thioredoxin, thioredoxin reductase and NADPH, and is ubiquitous from Archea to man. The physiological functions of thioredoxins in different types of organisms have evolved from a common fundamental reaction to large number of different specialized functions. Its main and conserved role is to provide hydrogen for various reductive enzymes. Thioredoxin protects cell against oxidative stress by scavenging ROS through a variety of direct or indirect mechanisms. There is a growing number of its distinct functions and participation in various macromolecular systems that play important role in oxidative stress.

8. Literatura

- Arnér, E.S.J. and Holmgren A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267, 6102-6109.
- Åslund F., Beckwith J. (1999) Bridge over troubled waters: sensing stress by disulphide bond formation. *Cell* 96, 751–753.
- Ayala, A., Muñoz M.F. and Argüelles S. (2014) Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 360438, 31.
- Bulteau, A. L., Szveda, L. I. and Friguet, B. (2006) Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging. *Exp. Gerontol.* 41, 653–657.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17, 1195-1214.
- Costa, V., Quintanilha, A. and Moradas-Ferreira, P. (2007) Protein Oxidation, Repair Mechanisms and Proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Life*, 59(4 – 5): 293–298.
- Curtin, J. F., Donovan, M. and Cotter, T. G. (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* 265, 49–72.
- Dizdaroglu M. (1992) Measurement of radiation-induced damage to DNA at the molecular level. *Int. J. Radiat. Biol.* 61, 175–183.
- Forman-Kay, J.D., Clore, G.M. and Gronenborn, A.M. (1992). Relationship between electrostatics and redox function in human thioredoxin: characterization of pH titration shifts using two-dimensional homo- and heteronuclear NMR. *Biochemistry* 31, 3442-3452.
- Hayashi, T., Ueno, Y. and Okamoto, T. (1993) Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 268, 11380–11388.
- Holmgren, A. (1995) Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 3:239-243.
- Holmgren A., Lu J. (2010) Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396 (2010) 120–124.
- Kang, S.W., Chae, H.Z., Seo, M.S., Kim, K., Baines, I.C., and Rhee, S.G. (1998) Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- alpha. *J. Biol. Chem.* 273, 6297-6302.

- Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., and Cuervo, A. M. (2004) Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol. Biol. Cell* 15, 4829-4840.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M. and Hocevar, B.A. (2010) Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, 38: 96-109.
- Martin J. L. (1995): Thioredoxin-a fold for all reasons. *Structure* 3, 245-250
- Nelson, D.L. and Cox M.M. (2013) *Lehninger, Principles of Biochemistry*, Sixth edition. New York : W.H. Freeman and Company, pp. 731-747, 1147-1148
- Petropoulos, I., and Friguet, B. (2005) Protein maintenance in aging and replicative senescence: a role for the peptide methionine sulfoxide reductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1703, 261-266.
- Raina S., Missiakas D. (1997): Making and breaking of disulfide bonds. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 179-202.
- Schweizer U., Brauer A. U., Kohrle J., Nitsch R., Savaskan N. E. (2004): Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res. Rev.* 45, 164-178.
- Toledano M.B. and Leonard W.J. (1991) Modulation of transcription factor NF-KB binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:4328-4332.
- Turrens J.F. (2003): Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552.2, pp. 335-344.
- Voet, D. and Voet, J.G. (2011) *Biochemistry*, Fourth Edition. New York : J. Wiley & Sons, pp. 1124-1125.
- Zhang, P., Liu, B., Kang, S.W., Seo, M.S., Rhae, S.G. and Obeid, L.M. (1997) Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 267, 24161-24164.