

Tomasz HEJMO, Aleksandra POTERAŁA, Dorota HUDY,
Magdalena SKONIECZNA, Joanna RZESZOWSKA-WOLNY
Politechnika Śląska

EKSPRESJA SYNTAZ TLENKU AZOTU I OKSYDAZ NADPH W KOMÓRKACH NAPROMIENIONYCH

Streszczenie. W pracy badano poziom wolnych rodników: anionorodnika ponadtlenkowego i tlenku azotu, a także poziomy transkryptów dla enzymów z grupy oksydaz NADPH (NOX5) i syntaz tlenku azotu (NOS) *in vitro* w komórkach nowotworu jelita grubego linii HCT116, kontrolnych i napromienionych. Przeprowadzono analizę korelacji w celu zbadania, czy pomiędzy wolnymi rodnikami i enzymami mogą istnieć sprzężenia zwrotne.

EXPRESSION OF NITRIC OXYGEN SYNTHASE AND NADPH OXIDASE IN IRRADIATED CELLS

Summary. We analyzed level of selected free radicals: superoxide anion and nitric oxide, and the levels of transcripts for NADPH oxidase (NOX5) and nitric oxygen synthase (NOS) in control and irradiated human colon carcinoma cells *in vitro*. Correlation analysis was performed in order to examine whether, there is a feedback between free radicals and enzymes.

1. Wolne rodniki

Wolne rodniki to cząsteczki posiadające niesparowany elektron, co decyduje o ich bardzo wysokiej reaktywności. W komórkach eukariotycznych do wolnych rodników zaliczane są reaktywne formy tlenu i azotu (ROS i RNS), które zaangażowane są w sygnalizację komórkową, reakcje odpornościowe, proliferację, różnicowanie komórek oraz apoptozę, tym samym odgrywają istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórki[9]. Reaktywne formy tlenu i azotu obejmują, oprócz rodników tlenowych (takich jak anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy, peroksyłowy i alkoksyłowy oraz tlenek azotu), cząsteczki o właściwościach utleniających oraz takie, które mogą być łatwo przekształcone w wolne rodniki: ozon, tlen singletowy, nadtlenek wodoru, anion azotanowy i kwas podchlorawy [3].

Wolne rodniki tlenowe powstają w wyniku metabolizmu tlenowego zachodzącego w komórce, na przykład w czasie aktywacji błonowej oksydazy NADPH, w łańcuchu oddechowym, w szlaku cyklooksygenazy (przemiana fosfolipidów błony komórkowej) i lipooksygenazy (utlenianie wielonienasyconych

kwasów tłuszczowych). Reaktywne rodniki tlenowe mogą indukować fosforylację i aktywację wielu białek sygnałowych: czynników transkrypcyjnych, kinaz serynowych, cytokin, czynników wzrostu czy kinaz tyrozynowych [9]. Podwyższony poziom ROS może powodować zastępowanie określonych czynników transkrypcyjnych innymi. Do czynników transkrypcyjnych wrażliwych na stężenie reaktywnych form tlenu należą NF- κ B, p53, HIF-1, PEBP2 i HSF [4].

Nadprodukcja reaktywnych form tlenu i azotu, w tym wolnych rodników, w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego na przykład promieniowaniem powoduje uszkodzenia oksydacyjne DNA i innych elementów komórki prowadząc do apoptozy lub mutacji. Podwyższony poziom reaktywnych form tlenu odgrywa rolę w patogenezie chorób takich jak nowotwory, choroba Parkinsona, Alzheimer, cukrzyca czy miażdżycy [11].

1.1 Anionorodnik ponadtlenkowy i tlenek azotu

Anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) powstaje poprzez redukcję cząsteczki tlenu. W komórkach może być pierwotnym produktem aktywności enzymów NOX lub powstawać w łańcuchu oddechowym (głównie w kompleksie I i III) [10]. Syntezę anionorodnika mogą przeprowadzać również cytochrom P450, oksydazy ksantynowe i syntazy tlenku azotu (NOS) [4]. Anionorodnik ponadtlenkowy jest cząsteczką wysoce reaktywną, o bardzo krótkim okresie półtrwania, która przekształcana jest do nadtlenu wodoru (H_2O_2) [6]. Reakcja ta może być katalizowana przez dysmutazę ponadtlenkową lub zachodzić spontanicznie w warunkach niskiego pH.

Tlenek azotu jest cząsteczką o stosunkowo niskiej reaktywności w porównaniu do innych wolnych rodników. Syntezowany z L-argininy i tlenu, przy udziale syntazy tlenku azotu (NOS), pełni funkcję immunomodulatora, neuroprzekaźnika i czynnika wazodylatacyjnego. Jest rozpuszczalny w wodzie i tłuszczach, dlatego może dyfundować przez błony komórkowe i cytoplazmę. Może pobudzać proliferację lub apoptozę (w zależności od stężenia) oraz uszkodzać DNA (pośrednio, poprzez wytworzenie peroksynitrytu) [10]. Tlenek azotu jest silnym inhibitorem enzymów posiadających atom żelaza w centrum aktywnym, w tym enzymów z klastrami żelazowo-siarkowymi, zaangażowanymi w transport elektronów w mitochondriach, reduktazy rybonukleotydomowej (bierze udział w replikacji DNA) oraz cis-akonitazy (katalizuje stereospecyficzną izomeryzację cytrynianu do izocytrynianu w cyklu Krebsa) [7]. Duże stężenia tlenku azotu, produkowane przez makrofagi, mogą oddziaływać z DNA i powodować pęknięcie nici – jest to element reakcji obronnej wobec mikroorganizmów pasożytniczych i niektórych komórek nowotworowych [8].

2. Oksydazy NADPH

Rodzina oksydaz NADPH obejmuje grupę białek transbłonowych o konserwatywnej strukturze, zdolnych do transportu elektronów z NADPH i redukcji tlenu do anionorodnika ponadtlenkowego lub nadtlenu wodoru:

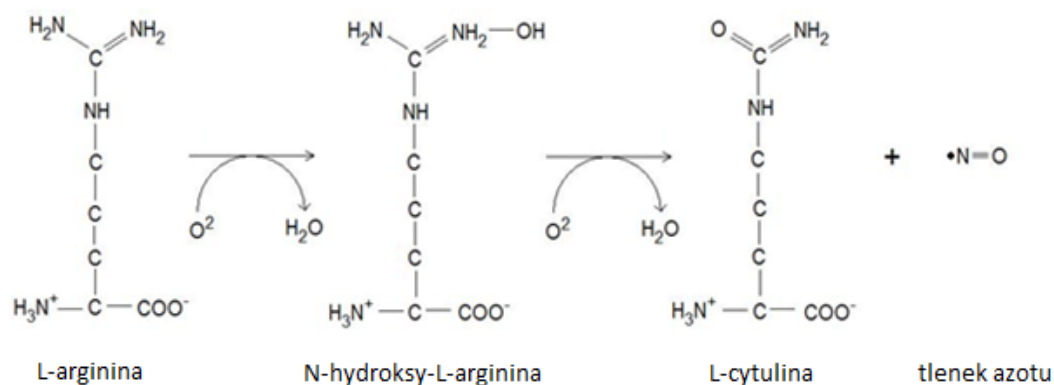


Elektron przekazywany jest z NADPH do FAD (dinukleotyduflawinoadeninowego), a następnie poprzez grupę hemową w NOX transportowany jest przez błonę [5].

Do oksydaz NADPH obecnych w komórkach ludzkich zalicza się NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 oraz DUOX2. NOX4, DUOX1 i DUOX2 produkują nadtlenek wodoru, natomiast NOX1-3 oraz 5 produkują anionorodnik ponadtlenkowy. Każde białko z rodziny NOX złożone jest z sześciu transbłonowych helis, które wiążą dwa kofaktory (hem). Domena znajdująca się na końcu C wiąże FAD/NADPH umożliwiając transfer elektronów do cząsteczki hemu. DUOX i NOX5 posiadają regiony wiążące wapń na końcu N, co odróżnia je od pozostałych oksydaz NADPH [12]. Białko NOX5 należy do najslabiej poznanych przedstawicieli rodziny oksydaz NADPH. Wpływ na to ma między innymi brak genu kodującego NOX5 u myszy i szczurów, co ogranicza możliwość wykorzystania tych zwierząt w badaniach [2]. W komórkach ludzkich gen NOX5 zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 15. Znanych jest sześć wariantów splicingowych: α , β , γ , δ , ϵ oraz ζ . Wiedza na temat funkcji NOX5 jest ograniczona i opiera się głównie na profilach ekspresji mRNA – dokładna rola i funkcjonowanie, w tym udział w produkcji wolnych rodników wymagają dalszych badań [2].

3. Syntazy tlenu azotu

NOS to enzymy z klasy dioksygenaz, odpowiedzialne za syntezę tlenu azotu z L-argininy i tlenu z wytworzeniem L-cytruliny, jako drugiego produktu reakcji. Synteza wymaga obecności kofaktorów: NADPH, FAD, FMN i BH₄ [8].



Rys. 1. Schemat syntezy tlenu azotu przez syntazę NOS

NOS, poprzez domenę reduktazową, transportuje elektrony z NADPH przez nukleotydy flawinowe FAD i FMN do hemu znajdującego się w domenie oksygenazowej, która wiąże również kofaktor BH₄, tlen cząsteczkowy i L-argininę [1]. Reakcja zachodzi dwuetapowo – najpierw NOS katalizuje hydroksylację L-argininy do N-hydrokso-L-argininy (rys. 1), a następnie utlenienie do L-cytruliny i tlenu azotu [7]. W komórkach ludzkich występują trzy izoformy syntazy tlenu azotu: indukowalna (iNOS), mózgowa nazywana też neuronalną (bNOS/nNOS) i endotelialna (eNOS). Wszystkie izoformy wiążą się z kalmoduliną (białkiem regulatorowym aktywowanym jonami Ca²⁺). Wiązanie bNOS i eNOS z kalmoduliną zachodzi w obecności wysokiego stężenia jonów wapnia i ułatwia transport

elektronów z NADPH do grupy hemowej (czemu towarzyszy zmiana stopnia utlenienia żelaza $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$). Indukowalna syntaza tlenku azotu (iNOS) wykazuje większe powinowactwo do kalmoduliny i wiąże się z nią nawet przy bardzo niskich stężeniach jonów wapnia [7]. Mózgowa syntaza tlenku azotu (bNOS) jest konstytutywnie ekspresjonowana, a jej aktywność regulowana jest poziomem wapnia wewnątrzkomórkowego. Aktywność endotelialnej syntazy tlenku azotu (eNOS) regulowana jest analogicznie do bNOS – głównie przez Ca^{2+} jednak, dodatkowo, eNOS może być regulowany przez białko szoku cieplnego (HSP90) i kaweolinę-1 [11]. Ekspresja iNOS indukowana jest przez czynniki, takie jak cytokiny, czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ) iliposacharydy bakteryjne. Enzym pierwotnie zidentyfikowano w makrofagach, jednak jego ekspresja może być indukowana we wszystkich komórkach i tkankach. Aktywność iNOS nie jest zależna od stężenia jonów wapnia [7].

4. Materiały i metody

Eksperymenty przeprowadzono na ludzkich komórkach nowotworu okrężnicy, linii HCT116 (human colon carcinoma) hodowanych *in vitro* w medium DMEM z 10% surowicy FBS (PAA), w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂, wilgotność 80%). Komórki napromieniano dawką 4 lub 12Gy przy pomocy iradiatora terapeutycznego Clinac 600, znajdującego się w Instytucie Onkologii w Gliwicach. Komórki nietraktowane (kontrolne) i napromienione badano w następujących punktach czasowych: 1, 3, 6, 8 12 i 24 godziny po napromienieniu.

Izolację RNA z komórek przeprowadzono przy użyciu zestawu odczynników Total RNA Mini Plus do izolacji bez użycia chloroformu (A&A Biotechnology). Odwrotną transkrypcję wykonano przy użyciu zestawu odczynników NG dART RT kit (EuRX) z wykorzystaniem starterów oligo(dT). Reakcję RT-qPCR prowadzono przy użyciu zestawu odczynników PCR Mix SybrGreen (A&A Biotechnology) w termocyklerze C1000 TouchTM (BioRad).

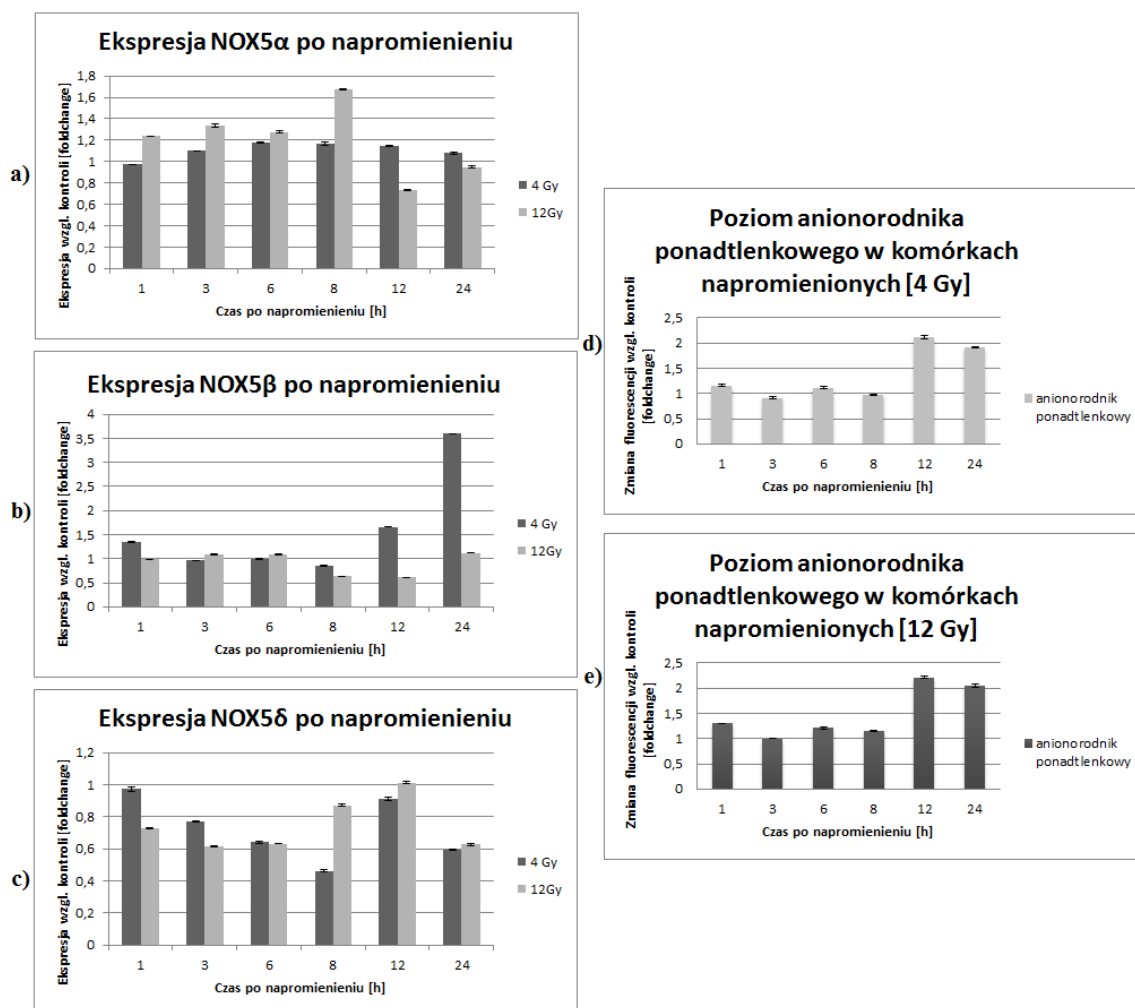
Poziom ekspresji badanych genów określano na podstawie wartości cyklu progowego (CT) w badanej próbce i kontroli korzystając z metody $2^{-\Delta C_T}$ (wzór 1), gdzie:

$$2^{-\Delta C_T} = 2^{-(C_{T \text{ kontrola, czas } x} - C_{T \text{ próbka, czas } x})} \quad (1)$$

Całkowity poziom anionorodnika ponadtlenkowego generowanego w mitochondriach oznaczono przy użyciu barwnika MitoSox (Life Technologies), a wewnątrzkomórkowego tlenku azotu przy pomocy dwuocianu 4-amino-5-metylamino-2',7'-difluoresceiny (DAF-FM diacetate, Life Technologies). Analizę wyznakowanych komórek prowadzono przy użyciu cytofluorometru przepływowego FACSariaTM III (Becton Dickinson) dla 10 000 komórek z każdej próbki.

5. Wyniki

Promieniowanie jonizujące indukuje produkcję anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach komórek HCT116, w dwunastej i dwudziestej czwartej godzinie od ekspozycji (rys. 2; d, e). Efekt nie zależy od zastosowanej dawki promieniowania.



Rys. 2. Ekspresja wybranych wariantów splicingowych oksydazy 5 NADPH (a-c) oraz poziom anionorodnika ponadtlenkowego (d-e) w komórkach napromienionych

Ekspresja syntazy tlenu azotu NOX5 α po ekspozycji na 4Gy nieznacznie wzrasta w szóstej, ósmej i dwunastej godzinie (15-20% w odniesieniu do kontroli). Dawka 12Gy promieniowania indukuje wzrost ekspresji w ósmej godzinie, a następnie spadek w dwunastej. Forma NOX5 β w komórkach napromienionych 4Gy wzrasta w dwunastej i dwudziestej czwartej godzinie, czyli w tych samych punktach czasowych, w których zaobserwowano wzrost poziomu anionorodnika ponadtlenkowego. Przy dawce promieniowania 12Gy efekt wzrostu ekspresji nie został zaobserwowany, w dwunastej godzinie ekspresja jest nawet niższa niż w kontroli.

Nie ma korelacji pomiędzy poziomem NOX5 β , a poziomem anionorodnika ponadtlenkowego. W komórkach napromienionych 4Gy współczynnik korelacji Spearmana wynosi 0,42, w napromienionych 12Gy spada do 0,12.

Tabela 1

Analiza korelacji poziomu anionorodnika nadadtlenkowego i wybranych wariantów NOX5 w komórkach napromienionych (współczynniki korelacji Spearmana)

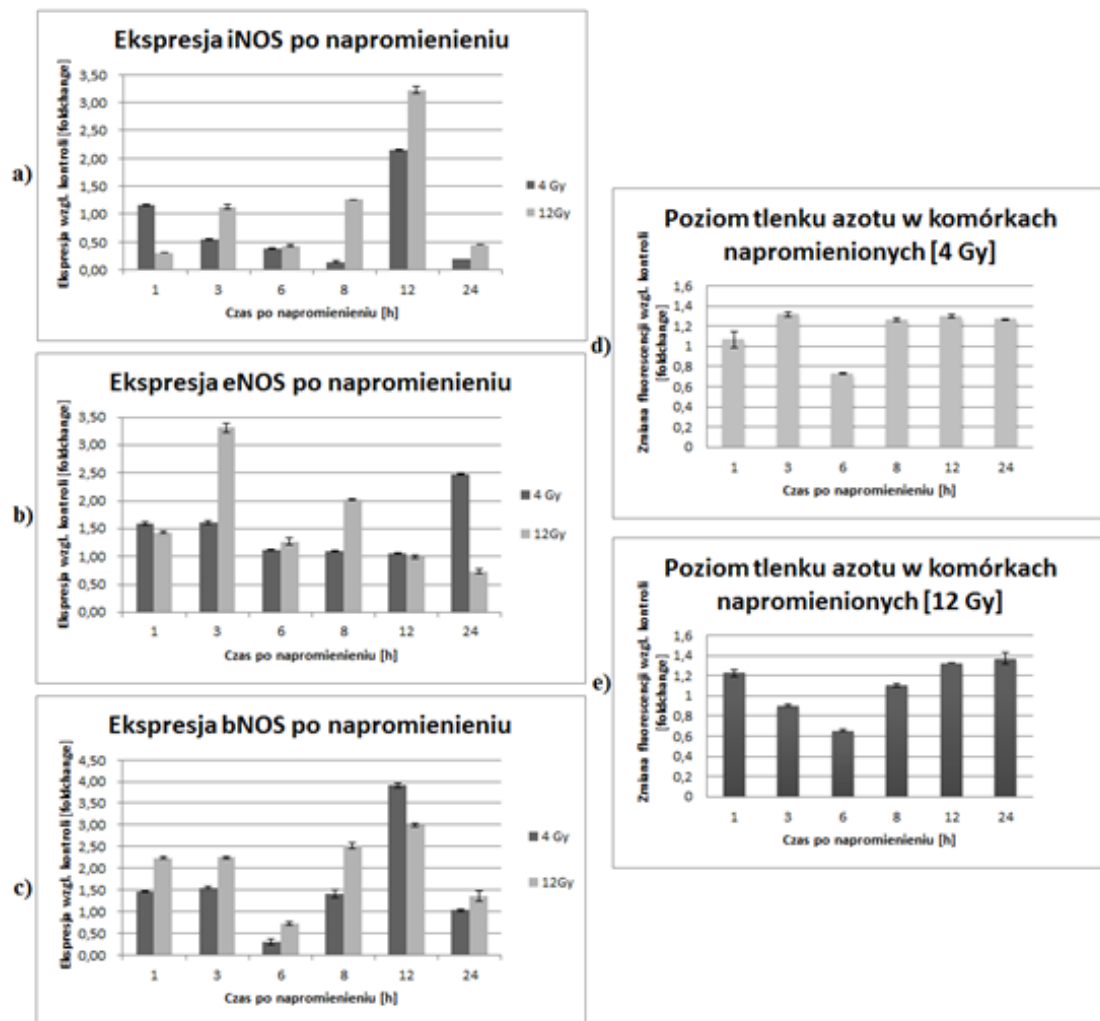
		NOX5 α	NOX5 β	NOX5 δ
anionorodnik nadadtlenkowy	4Gy	0,05	0,45	0,27
	12Gy	-0,58	0,12	0,12

Zaskakującym wynikiem jest obniżenie ekspresji NOX5 δ w komórkach napromienionych. Weyemi i wsp. wykazali, że obniżenie ekspresji NOX5 chroni DNA komórki przed uszkodzeniem oksydacyjnym wywołanym promieniowaniem, jednak eksperyment przeprowadzony przez ten zespół polegał na wyciszeniu genu (zmiana ekspresji była wywołana siRNA, a nie samym promieniowaniem), a dodatkowo nie uwzględniał form splicingowych genu NOX5[12]. Brakuje więc danych literaturowych pozwalających na porównanie uzyskanego rezultatu.

Jeśli chodzi o poziom tlenu azotu w komórkach napromienionych, nieznacznie wzrasta on w niektórych punktach czasowych (wzrost rzędu 20-40% względem kontroli) (rys. 3; d,e).

Co ciekawe, zarówno przy zastosowaniu dawki 4Gy, jak i 12Gy istotny statystycznie spadek poziomu tlenu azotu zaobserwowano w szóstej godzinie od ekspozycji. Podobnie jak podczas analizy poziomu anionorodnika nadadtlenkowego, stwierdzono, że zastosowanie większej dawki promieniowania nie powoduje zwiększonej produkcji tlenu azotu. Przy dużym stężeniu tlenu azotu może on działać jak zmiatacz wolnych rodników, obniżając poziom anionorodnika nadadtlenkowego oraz obniżając zwrotnie ekspresję indukowalnej syntazy tlenu azotu [13]. Nie zaobserwowano takiej relacji w napromienionych komórkach HCT 116, prawdopodobnie w związku ze zbyt niskim stężeniem NO.

Promieniowanie jonizujące wpływa na ekspresję wszystkich izoform syntazy tlenu azotu - zarówno indukowalnej iNOS, jak i konstytutywnie ekspresjonowanych bNOS i eNOS (rys. 3; a-c). Ekspresja iNOS może być indukowana promieniowaniem, efekt nie jest jednak obserwowany bezpośrednio po ekspozycji. Poziom iNOS gwałtownie wzrasta w 12 godzinie po napromienieniu. Dodatkowo, ekspresja iNOS w tym punkcie czasowym jest większa w komórkach eksponowanych na promieniowanie 12Gy, niż w napromienionych 4Gy. W tym punkcie czasowym nie stwierdzono jednak szczególnych zmian w poziomie tlenu azotu - jest on o około 30% wyższy niż w komórkach kontrolnych, jednak taki sam poziom zaobserwowano w innych punktach czasowych (trzeciej, ósmej i dwudziestej czwartej godzinie po ekspozycji). Wartości współczynników również nie wskazują na istnienie korelacji (współczynnik korelacji w komórkach napromienionych 4Gy: 0,36, 12Gy: 0,27).



Rys. 3. Ekspresja izoform syntazy tlenu azotu (a-c) oraz poziom tlenu azotu (d-e) w komórkach napromienionych

Nie oznacza to, że iNOS nie jest zaangażowana w produkcję tlenu azotu w komórkach HCT116, sugeruje to raczej, że nie jest to główny lub jedyny enzym odpowiedzialny za, stymulowaną promieniowaniem produkcję NO.

Podobny wniosek płynie z analizy ekspresji endotelialnej syntazy tlenu azotu, której poziom zmienia się w niektórych punktach czasowych, jednak nie koreluje ze zmianą poziomu tlenu azotu.

Tabela 2

Analiza korelacji poziomu tlenu azotu i syntaz NOS w komórkach napromienionych (współczynniki korelacji Spearmana)

		iNOS	bNOS	eNOS
tlenek azotu	4Gy	0,37	0,27	-0,04
	12Gy	0,23	-0,19	-0,60

Mózgowa syntaza tlenu azotu jest izoformą wykazującą największe zmiany poziomu ekspresji wywołane ekspozycją na promieniowanie. Szczególnie dawka 4Gy wywołuje duże zmiany, w tym spadek ekspresji w szóstej i wzrost w dwunastej godzinie po napromienieniu (rys. 3; c).

Uzyskane wyniki poziomu transkryptu mRNA, nie potwierdzają jednoznacznie, aby któraś z badanych izoform NOS była dominującym enzymem zaangażowanym w produkcję tlenu azotu indukowaną promieniowaniem. Badane poziomy reaktywnych form azotu mogą być wynikiem bezpośredniej ekspozycji komórek na promieniowanie jonizujące.

6. Wnioski

Ekspozycja na promieniowanie powoduje wzrost produkcji anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach w dwunastej i dwudziestej czwartej godzinie po napromienieniu.

Efekt indukcji produkcji anionorodnika ponadtlenkowego jest niezależny od stosowanej dawki.

Poziom tlenu azotu w napromienionych komórkach HCT116 wzrasta w niektórych punktach czasowych, natomiast w ósmej godzinie od napromienienia spada poniżej wartości kontroli niezależnie od zastosowanej dawki promieniowania.

Uzyskane wyniki nie wskazują jednoznacznie na to, aby badane izoformy syntazy tlenu azotu (iNOS, eNOS lub bNOS) lub oksydazy NADPH NOX5 odgrywały wiodącą rolę w produkcji, odpowiednio tlenu azotu i anionorodnika ponadtlenkowego po napromienieniu.

**Praca finansowana ze środków BKM/506/RAU1/2016/ (A.P.),
BK-213/Rau-1/2016, t.3 (T.H.), oraz NCN 2012/07/B/NZ1/00008(J.R.W.),
NCBiR PBS3/B3/32/2015 (M.S.).**

LITERATURA

1. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G.: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 2001, Vol. 357, p. 593–615.
2. Bedard K., Jaquet V., Krause K.H.: NOX5: From basic biology to signaling and disease. *Free Radicals Biology & Medicine*, 2012, Vol. 52, p. 725–734.
3. Bedard K., Krause K.H.: The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiological Reviews*, 2007, Vol. 87, p. 245–313.
4. Boldogh I., Bacsı A., Choudhury B.K., Dharajiya N., Alam R., Hazra T.K., Mitra S., Goldblum R.M., Sur S.: ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 2005, Vol. 115, p. 2169–2179.
5. Brown D.I., Griendling K.K.: Nox proteins in signal transduction David. *Free Radicals Biology & Medicine*, 2009, Vol. 47, p. 1239–1253.
6. Djordjevic D., Jakovljevic V., Cubrilo D., Zlatkovic M., Zivkovic V., Djuric D.: Coordination between nitric oxide and superoxide anion radical during

- progressive exercise in elite soccer players. *The Open Biochemistry Journal*, 2010, Vol. 4, p. 100–106.
7. Ferrer-Sueta G., Radi R.: Chemical biology of peroxynitrite: Kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chemical Biology*, 2009, Vol. 4, p. 161–177.
 8. Forstermann U., Sessa W.C.: Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, 2012, Vol. 33, p. 829–837.
 9. Ługowski M., Saczko J., Kulbacka J., Banaś T.: Reaktywne formy tlenu i azotu. *Polski Merkuriusz Lekarski*, 2011 Vol. 31, p. 313–317.
 10. Morel Y., Barouki R.: Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochemical Journal*, 1999, Vol. 342, p. 481–496.
 11. Murphy M.P.: How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 2009, Vol. 417, p. 1–13.
 12. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D, Mazur M., Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, Vol. 39, p. 44–84.
 13. WeyemiU., RedonC.E., AzizT., ChoudhuriR., MaedaD.,ParekhP.R, BonnerM.Y., ArbiserL., BonnerW.M.: Inactivation of NADPH Oxidases NOX4 and NOX5 Protects Human Primary Fibroblasts from Ionizing Radiation-Induced DNA Damage. *Radiation Research*, 2015, Vol. 183, p. 262–270.