

Henna-Kaisa Jyrkkänen

27.8.2013

Itä-Suomen yliopisto

Lääketieteen syventävien tutkielma

Hapettuneiden ja nitrattujen rasvahappojen aktivoimat signaalitiet

Johdanto

Tyydyttymättömät, fosfoglyseroliryhmästään esteröityneet sekä vapaat rasvahapot reagoivat soluissa reaktiivisten hapen tai typen yhdisteiden (reactive oxygen species; ROS, reactive nitrogen species; RNS) kanssa, esimerkiksi tulehdustiloissa, kuten ateroskleroosissa. Muodostuvat hapen ja typen reaktiiviset yhdisteet ovat elektrofiilisiä molekyyliä, joilla on rakenteessaan elektronivajaus uloimmalla sidosorbitalilla, mikä tekee yhdisteistä voimakkaasti reagoivia [1]. Elektrofiiliset rasvahapot reagoivat edelleen nukleofiilisten molekyylien tai niiden osien, kuten proteiinien kysteiinitähteiden kanssa. Nukleofiilillä molekyyliellä on uloimmalla sidosorbitalilla vapaa elektronipari, jonka ne pyrkivät luovuttamaan muodostaen kovalenttisen sidoksen. Elektrofiilit osallistuvat kemiallisiin reaktioihin, joissa muokataan signaalointiteiden aktivaatioissa ja solun hapetusasapainon säätelyssä tärkeitä proteiineja näiden translaation jälkeen. Proteiinien kysteiinitähteet ovat fysiologisessa pH:ssa ionisoituneessa muodossaan, jolloin ne voivat reagoida elektrofiilisten rasvahappojen tyydyttymättömien karbonyyliryhmien kysteiinitähteiden kanssa Michaelin additioreaktiolla, johtaen proteiinin rakenteen ja toiminnan muovautumiseen [2]. Tämän työn tarkoituksena on esitellä ja tehdä yhteenveto kolmesta signaalitiestä, jotka aktivoituvat elektrofiilisten rasvahappojen vaikutuksesta edellä kuvattujen reaktioiden kautta sekä lisäksi mahdollisesti vaikuttavat toinen toistensa toimintaan. Nämä signaalintiet ovat Keap1-Nrf2-signalointitie (Kelch-like-ECH-associated protein 1-Nuclear Factor E2-Related Factor 2-signaling pathway), lämpöshokkivaste (heat shock response; HSR) ja laskostumattomien proteiinien aktivoima vaste (unfolded protein response, UPR).

Elektrofiilisten rasvahappojen muodostuminen

On havaittu, että hapen ja typen reaktiivisten yhdisteiden lisäksi näiden reaktiotuotteina syntyneet tyydyttymättömät rasvahapot voivat reagoida edelleen muiden molekyylien kanssa tulehdustiloissa aktivoiden signaalointiteitä esimerkiksi ateroskleroosin patogeenisissä. Reagoivia rasvahappoja ovat esimerkiksi solukalvojen rakenteeseen kuuluvat monitydyttymättömät rasvahapot (PUFA), joista muodostuu useiden patologisten tilojen yhteydessä aktiivisesti reagoivia molekyyliä. Ateroskleroosissa biologisesti aktiiviset rasvahapot syntyvät pääasiassa tulehdussoluissa. Michaelin additioreaktioiden lisäksi hapettumisen aiheuttama molekyylien pilkkoutuminen johtaa esimerkiksi biologisesti aktiivisten hydroperoksidien, isoprosaanien ja lyhytketjuisten aldehydien, kuten 4-hydroksyylinonenaali (HNE), muodostumiseen monitydyttömättömistä rasvahapoista [3,4]. Tärkeitä ovat myös arakidonihapon ei-entsyymaattisessa hapettumisessa muodostuvat prostaaniirenkkaat. J_2 -sarjan prostaglandiinit ovat prostaglandiini D_2 :n dehydraatit tuotteita, joista muodostuu esimerkiksi 15-d-PG J_2 - molekyyli, jolla tiedetään olevan vaikutuksia useisiin signaalointiteihin [5]. Samankaltaisia rakenteita esiintyy myös minimaalisesti modifioidun matalatiheyksisen lipoproteiinipartikkelin (mmLDL) rasvahapoissa. Yksi näistä

on 1-palmityyli-2-(5,6-epoksi-isoprostaani e2)-sn-glysero-3-fosfokoliini (PEIPC), jonka tiedetään aktivoivan UPR- ja Keap1-Nrf2-signaaliteitä [6-8]. Hapettuneiden fosfolipidien tiedetään olevan mukana ateroskleroosin varhaisvaiheissa ohjaamassa signaaliteiden aktivoitumista [9]. Rasvahappojen hapettumisen loppuvaiheen tuote, HNE, sen sijaan esiintyy ateroskleroottisissa leesioissa ja hapettuneessa LDL:ssä [10]. Hapettumisen lisäksi rasvahapot voivat reagoida typpioksidin kanssa, jolloin muodostuu nitrattuja rasvahappoja, kuten nitrattua öljyhappoa (OA-NO₂). Nitratut rasvahapot reagoivat nukleofiilisten aminohappojen, kuten tioliryhmien, kanssa johtaen signaalointiteiden aktivaatioon [11]. Fysiologisesti näitä yhdisteitä syntyy esimerkiksi iskemia-reperfuusiovauriossa [12].

Keap1-Nrf2-signaalointitie

Keap1-Nrf2-signaalointitie säätelee soluja suojaavien geenien ilmentymistä vasteena hapetus- ja elektrofiiliselle stressille. Keap1 on solun hapetustasapainolle herkkä proteiini, jonka modifioituminen johtaa Nrf2-transkriptiotekijän aktivoitumiseen. Aktivoiduttuaan Nrf2 kulkeutuu tumaan, jossa se sitoutuu antioksidanttivaste-elementtiin (ARE) kohdegeeniensä säätelyalueilla, aktivoiden geenien luennan.

Keap1 proteiini sisältää viisi aluetta, jotka ohjaavat sen toimintaa. tramtrack and bric-a-brac domain (BTB)-alueen välityksellä kaksi Keap1-molekyyliä sitoutuvat toisiinsa ja muodostavat "cherry-bob" rakenteen [13]. Samalta alueelta Keap1 on myös sitoutuneena ubikitiiniligaasi Cullin3:n, joka liittyy ubikitiinin Nrf2:een. Nrf2 sitoutuu Keap1:n c-terminaaliossa olevaan Kelch-alueeseen [14]. Fysiologisissa olosuhteissa Keap1 sitoo Nrf2:n itseensä, toimien adapterina Cullin3-ligaasin ja Nrf2:n välillä. Cullin3-ligaasi ubikitinoi Nrf2:n ja Nrf2 ohjautuu proteosomaalisesti hajotettavaksi. Keap1:ssä on BTB- ja Kelch-alueiden välissä IVR (intervening region), joka sisältää useita kysteiinitähteitä. Kysteiinitähteet ovat herkkiä reagoimaan elektrofiilisten yhdisteiden, kuten hapettuneiden tai nitrattujen rasvahappojen kanssa [15,16]. Kysteiinitähteen reaktio johtaa Keap1:n konformaation muutokseen sekä edelleen Nrf2:n ubikitinaation ja hajotuksen estymiseen. Kaksi toisiinsa sitoutunutta Keap1-molekyyliä sitovat Kelch-alueillaan yhden Nrf2-molekyylin kahdesta eri kohdasta. Keap1:n kysteiinitähteen modifikaation seurauksena toisen Keap1:n sidos irtoaa, johtaen Nrf2:n orientaation muutokseen ja ubikitinaation epäonnistumiseen [17]. Nykykäsityksen mukaan Nrf2 ei kuitenkaan irtoa kompleksista vaan antaa mahdollisuuden uudistuotetuille Nrf2-molekyyleille kulkeutua tumaan ja aktivoida kohdegeenien ilmentymisen [18]. Tumassa Nrf2 muodostaa kompleksin pienten Maf-proteiinien kanssa ja tämä kompleksin edelleen sitoutuu ARE:n kohdegeenien säätelyalueella [19].

Nrf2:n kohdegeenit on identifioitu profiloimalla Nrf2-poistogeenisten hiirten geenien ilmentymistä. Kohdegeenit voidaan luokitella useisiin kategorioihin, joista tärkeimpiä ovat vierasaineiden metaboliaan osallistuvia proteiineja koodaavat geenit, kuten glutationi-s-transferaasi (GST), NAD(P)H-kinoni oksidoreduktaasi (NQO1), hemioksygenaasi-1 (HO1) ja glutationin synteesiä säätelevä glutationikysteiiniligaasi (GCL). Lisäksi Nrf2 aktivoi proteosomaalisia geenejä ja chaperoniproteiineja osoittaen Nrf2:n tärkeän roolin vaurioituneiden proteiinien korjaamisessa ja poistamisessa [20,21].

Keap1 elektrofiilien sensorina

Kemiallisista aineista monet, jotka johtavat ARE-välitteisten geenien luennan aktivoitumiseen, on identifioitu tutkimalla NQO1-geenin säätelyalueen aktivaatiota [22]. Tulokset osoittivat aktivaation tapahtuvan useiden, keskenään kemiallisesti hyvin erilaisten aineiden vaikutuksesta. Yhteistä näille aineille on, että ne kaikki reagoivat kysteiinitähteiden kanssa [23]. On myös havaittu, että ARE:a aktivoivat yhdisteet sitoutuvat Keap1:een, osoittaen Keap1:n roolin ARE:n aktivaatiossa ekso- ja endogeenisten

yhdisteiden vaikutuksesta. Keap1:n 27 kysteiniinitähdettä ovat reaktiivoimakkuuksiltaan erilaisia ja kysteiniinien välillä on herkkyyseroja erilaisille kemiallisille aineille. ARE-aktivaation kannalta tärkeimmiksi kysteiniinitähteiksi (Cys) ovat osoittautuneet Cys151, Cys273 ja Cys288 [15,24]. Kysteiniinitähteiden funktionaalisuus on osoitettu reportterigeenimenetelmällä ja koe-eläinmalleissa mutatoimalla Keap1:n kysteinejä yksi kerrallaan. Reportterigeenimenetelmää käytettäessä Keap1-proteiinin toiminnan kannalta merkityksellisen kysteiniin mutaatio estää tai vähentää reportterikonstruktion aktivoitumista. Kysteiniinien roolissa voi olla myös eroja fysiologisten olosuhteiden ja solujen stressitilanteen välillä siten, että eri kysteineillä on erilainen tai erisuuruinen vaikutus olosuhteista riippuen. Reportterimenetelmän lisäksi kysteiniinien merkitys on myös osoitettu eläinmallissa, jossa siirtogeenisen hiiren genomista on mutatoitu Cys273 ja Cys288 [25]. Mutaatio johtaa Keap1:n kyvyttömyyteen ohjata Nrf2 hajotettavaksi sekä jatkuvaan Nrf2:n aktivaatioon, mikä ilmeni lisääntyneenä kohdegeenien ilmentymisenä. Cys273 ja Cys288 vaikuttavat olevan tärkeitä fysiologisissa olosuhteissa tapahtuvassa Keap1:n säätelyssä. Sen sijaan Cys151 on tärkeä elektrofiilisten yhdisteiden vaikutuksesta tapahtuvassa aktivaatiossa. Reportterigeenimenetelmällä ja seepprakaloissa tehdyissä mutaatiokokeissa on osoitettu, että paljon käytetyt ARE-aktivaattorit, kuten sulforafaani ja tertbutyylihydrokinoni, aktivoivat ARE-geenien ilmentymistä Keap1:n Cys151-riippuvaisesti [17,24]. Fysiologiseen geenien ilmentymistasoon Cys151:n mutaatiolla sen sijaan ei ole osoitettu olevan vaikutusta. Cys151:n modifioituminen häiritsee Cullin3-ubikitiiniligaasin toimintaa, mahdollisesti muuttamalla molekyylikompleksin konformaatiota [26].

Nrf2:n aktivaatiomekanismi

Tutkimustulokset ovat osoittaneet, että Keap1:n kysteiniinien modifikaatio johtaa Nrf2:n kertymiseen tumaan ja Nrf2:n kohdegeenien ilmentymisen lisääntymiseen. Aikaisemmin oletettiin, että Keap1 fysiologisissa olosuhteissa sitoo Nrf2:n sytoplasmaan ja, että elektrofiilinen stressi johtaa Nrf2:n vapautumiseen, ohjautumiseen tumaan ja kohdegeenien luennan aktivaatioon. Sittemmin on kuitenkin osoitettu, että Keap1 ja Nrf2 eivät irtoa toisistaan ja uusia malleja aktivaatiomekanismeista on esitetty.

Fysiologisissa olosuhteissa Keap1 toimii adapterina Cullin3-ubikitiiniligaasille, johtaen nopeaan Nrf2:n ubikitinaatioon ja hajotukseen [27]. Nrf2 on sitoutuneena Keap1:n kahdelta alueelta (DLG ja ETGE) ja lysiinitähteet, joihin ubikitiini kiinnittyy, sijaitsevat näiden sitoutumisalueiden välissä. Elektrofiilisessä stressissä, Keap1:n kysteiniinit modifioituvat ja konformaatio muuttuu, johtaen sidoksista heikomman katkeamiseen Keap1:n ja Nrf2:n DLG-alueiden välillä [28]. Nrf2:n ETGE-alueen ja Keap1:n välinen sidos säilyy, mutta ubikitinaatio estyy. On myös osoitettu, että tietyt ARE-aktivaattorit, kuten sulforaani, häiritsevät Keap1:n ja Cullin3-ligaasin välistä sidosta [29].

Myös Keap1:n kulkemista sytoplasman ja tumman välillä on ehdotettu Nrf2-aktivaation malliksi [30]. Hypoteesin mukaan Keap1 toimisi fysiologisissa olosuhteissa Nrf2:n kuljettajaproteiinina tumasta pois ja elektrofiiliset yhdisteet vaikuttaisivat estämällä Keap1:n tumalokalisointia. Hypoteesia vastaan puhuu kuitenkin osoitus siitä, että vain pieni osa Keap1:n kokonaismäärästä on tumassa, joten hypoteesin mukainen säätely voisi olla vain marginaalista. Aktivoivien aineiden on myös esitetty vaikuttavan ohjaamalla ubikitinaation kohdentumisen Keap1:teen Nrf2:n sijaan [31]. Useiden proteiinikinaasien on myös osoitettu vaikuttavan Nrf2:n säätelyyn. Proteiinikinaasi C fosforyloi Nrf2:n seriini 40:tä, mikä johtaa Nrf2:n ja Keap1:n välisen sidoksen katkeamiseen [32]. Myös proteiinikinaasin RNAn kaltaisen ER-kinaasin (PERK) on osoitettu fosforyloivan Nrf2:n johtaen Nrf2:n kertymiseen tumaan [33]. Hiljattain on myös osoitettu p21- ja sequestosome-1 proteiinien kilpailevan sitoutumisesta Keap1:n ja Nrf2:n kanssa häiriten Keap1-Nrf2-kompleksin muodostusta [34].

Lämpöshokkivaste

ARE-välitteisen geenien säätelyn lisäksi soluilla on myös muita signalointiteitä, jotka aktivoituvat vasteena endogeeniselle tai eksogeeniselle stressille. HSR on ohjelmoitu vaste monille erilaisille akuuteille ja kroonisille tiloille, kuten lämmölle, metabolisille säätelyhäiriöille, elektrofiilleille ja tulehdusta edistävälle reaktiivisille yhdisteille [35]. HSR on säädelty transkriptionaalisella tasolla lämpöshokkitekijöiden kautta ja merkittävin rooli on lämpöshokkitekijä 1:llä (heat shock factor 1, HSF1) [36]. HSF1:n aktivaatiomekanismia ei vielä täysin tunneta. Tiedetään, että HSF1 on inaktiivisena solulimassa muodostaen kompleksin lämpöshokkiproteiini 90:n kanssa. Lämpöshokkivasteen aktivoituessa HSF1 käy läpi moniportaisen muokkausketjun, siirtyy tumaan ja muodostaa toisten HSF1-molekyyliden kanssa trimeerin, joka sitoutuu kohdegeenin säätelyalueella olevaan lämpöshokkivaste-elementtiin (heat shock element, HSE) käynnistäen kohdegeenin luennan. HSF1:n kohdegeenejä ovat esimerkiksi chaperonit, proteaasit ja monet muut proteiinit, jotka suojaavat soluja proteotoksista stressiä vastaan [36].

Elektrofiilisten rasvahappojen, kuten HNE:n [37], 15d-PG₂:n [38] ja OA-NO₂:n [39], on osoitettu aktivoivat HSF1-riippuvaisesti lämpöshokkivasteen geenejä. Elektrofiilisten rasvahappojen tiedetään häiritsevän solulimassa HSF1:n ja sen toimintaa estävien proteiinien välistä sidosta, johtaen sidoksen katkeamiseen [37]. On myös osoitettu, että elektrofiiliset rasvahapot voivat sitoutua HSP90:n kysteiinitähteisiin, mikä johtaa HSP90:n ja HSF1:n välisen kompleksin rikkoutumiseen ja HSF1:n aktivaatioon [40].

Sekä HSR- että Keap1-Nrf2-signaalitiet aktivoituvat samojen elektrofiilisten rasvahappojen vaikutuksesta, mutta näiden kahden signaalitien vaikutuksista toisiinsa ei ole selkeää käsitystä. Geenien ilmentymisen genomilaajuinen profilointi endoteelisoluista, joista Nrf2 on hiljennetty pieniä häiritseviä RNA-molekyylejä hyödyntämällä ja jotka lisäksi on käsitelty OA-NO₂:lla, on osoittanut, että Nrf2:lla ei ole vaikutusta HSF1:n kohdegeenin ilmentymiseen [39]. Myös HSF1-poistogeenisiä fibroblasteja tutkimalla on osoitettu, ettei HSF1:n puutteella ole vaikutusta Nrf2:n kohdegeenin ilmentymiseen [41]. Havainnot osoittavat, että signaalitiet ovat suurelta osin itsenäisiä ja toisistaan riippumattomia. Toisaalta on myös osoitettu, että lämpöshokki johtaa HSP90:n ja Nrf2:n inhibiittorin, Keap1:n, interaktioon ja siten Nrf2:n irtautumiseen Keap1-Cullin3-kompleksista sekä aktivaatioon [42]. Lisäksi myös vaihtoehtoisesti pilkkoutunut eukaryoottien elongaatiotekijä 1B α -proteiini voi aktivoida sekä HSR- että Keap1-Nrf2-signaaleita [43]. Tulokset antavat siten viitettä siitä, että nämä kaksi signaalitietä jakaisivat yhteisiä signalointiproteiineja reittien alkuosissa, mikä voisi selittää signaaliteiden aktivoitumisen samojen aktivoivien aineiden vaikutuksesta.

Laskostumattomien proteiinien aktivoima signaalitie (unfolded protein response, UPR)

Solulimakalvostolla muodostetaan eritettävät ja solukalvon läpäisevät proteiinit, minkä vuoksi solulimakalvoston toiminta on tarkoin säädeltyä ja herkkä toiminnan häiriöille. Väärin laskostuneiden tai laskostumattomien proteiinien kerääntyminen solulimakalvostoon aktivoi mukauttavan signalointitien, UPR:n, joka tunnetaan myös nimellä solulimakalvoston stressivaste [44]. UPR modifioi geenien ilmentymistä ja proteiinien translaatiota, tarkoituksena säilyttää ja tukea solulimakalvoston kykyä ylläpitää proteiinien laskostusta ja tasapainoa. Pitkittynyt solulimakalvoston stressi johtaa apoptoosiin aktivoitumiseen solujen korjauskapasiteetin ylittyessä. Solujen sopeutumista lisäävät ja apoptoosiin johtavat signalointitiet ovat tärkeitä ateroskleroosin synnyssä. UPR koostuu kolmesta signalointireitistä, jotka alkutilanteessa aktivoituvat saman säätelyproteiinin, solulimakalvoston chaperoniproteiini GRP78:n, kautta. GRP78 sitoo signalointireittejä ohjaavat säätelytekijät solulimakalvostolle fysiologisissa olosuhteissa. Aktivoituvat säätelytekijät ovat ATF6 (activating transcription factor-6), IRE1 (inositol requiring factor-1) ja

PERK. Signaalintiteiden aktivoituminen johtaa säätelyproteiinien ja GRP78:n välisen kompleksin purkautumiseen ja välivaiheiden kautta kohdegeenien luennan aktivoitumiseen signaalintireitin aktivoimien säätelytekijöiden välityksellä. ATF6 kuljetetaan GRP78:sta vapautumisen jälkeen golgin laitteelle, jossa proteaasit pilkkovat sen lyhyempään muotoon. ATF6:sta muodostunut lyhyt muoto kulkeutuu tumaan ja sitoutuu kohdegeeniensä säätelyalueelle [44]. ATF6:n kohdegeenejä ovat monet apoptoosin säätelyyn osallistuvat geenit sekä verisuonikasvutekijät. IRE1 on solulimassa toimiva proteiini, joka muokkaa XBP1-proteiinin (X-box binding protein-1) aktiiviseen muotoon. Lyhyt XBP1 siirtyy tumaan ja aktivoi proteiinien muovautumiseen ja hajotukseen osallistuvien kohdegeeniensä luennan [44]. PERK aktivoi fosforyloimalla kaksi säätelytekijää, Nrf2:n ja ATF4:n [33,45]. Molemmilla säätelytekijöillä on omat sitoutumispaikkansa ja kohdegeeniensä. Nrf2:n toiminta on ollut esillä aikaisemmin tässä yhteenvedossa. ATF4 säätelee erityisesti pitkittyneissä stressiolosuhteissa apoptoosia edistävien geenien ilmentymistä [46].

Solujen transkriptionaalisella profiloinnilla on havaittu UPR:n kohdegeenien aktivoituvan HNE ja hapettuneen 1-palmityyli-2-arakinoni-sn-glysero-3-fosfokoliini (oxPAPC) altistusten jälkeen [47,48]. OxPAPC on yhdiste, joka sisältää kemialliselta rakenteeltaan hyvin erilaisia molekyyliä ja UPR-aktivaation kannalta oleellisin näyttää olevan PEIPC, joka sisältää rakenteellisesti prostaglandiinien kaltaisen rengasrakenteen [49]. Keskenään hyvin erilaiset elektrofiiliset rasvahapot pystyvät aktivoimaan UPR:n ja toistaiseksi rasvahappojen vaikutusmekanismi on jäänyt epäselväksi. Käyttämällä fluoresoivalla merkkiaineella leimattuja molekyyliä, on osoitettu joidenkin elektrofiilisten rasvahappojen sitoutuvan GRP78:n ja kerääntyvän solulimakalvostolle [40,50]. Näiden tulosten perusteella on esitetty, että UPR:n aktivaation taustalla voisi olla GRP78:n suora modifikaatio elektrofiilisten yhdisteiden vaikutuksesta, mikä johtaisi signaaliteiden aktivoitumiseen [51]. Hapettuneiden fosfolipidien on toisaalta myös osoitettu vaikuttavan solulimakalvoston biofysikaalisiin ominaisuuksiin kerääntymällä kalvoille vastaavalla tavalla kuin vapaa kolesteroli kerääntyy makrofaageihin. Solukalvoilla sijaitsevien fosfolipidien hapettuminen aiheuttaa kalvon laajenemisen ja muuttaa orientaatiota huonommaksi, siten että hapettuneet ryhmät kääntyvät vesifaasiin päin [52]. Nämä muutokset solulimakalvoston ominaisuuksissa vaikuttavat kalvoproteiinien rakenteeseen ja toimintaan, ja on spekuloitu, että solukalvon läpi kulkevat proteiinit, kuten GRP78, voisivat aktivoitua tätä kautta. Hypoteesia tukee havainto, että fosfatidyylietanoliinilla modifioitu ketoaldehydi kerääntyy solulimakalvostolle ja aktivoi UPR:n vaikuttamatta yhdenkään proteiinin prosessointiin tai reaktiivisuuteen [53].

UPR:llä ja Keap1-Nrf2-signaaliteilla on yhtymäkohtia. UPR-aktivaattorit aktivoivat Nrf2:n PERK-välitteisen fosforylaation kautta [33]. Huolimatta siitä, että oxPAPC aktivoi sekä UPR:n että Nrf2:n, ei PERK-välitteisellä fosforylaatiolla näytä olevan suurta merkitystä Nrf2:n aktivaation kannalta [8]. Tämä on osoitettu mittaamalla Nrf2-kohdegeenien ilmentymistä PERK-poistogeenisten hiirten fibroblasteista oxPAPC käsittelyn jälkeen ja tulokset osoittivat, että kohdegeenien ilmentyminen oli hieman vähentynyt, mutta ei täysin estynyt soluissa, joista PERK:iä ei ilmennetty lainkaan. ATF4:n on myös osoitettu olevan Nrf2:n kohdegeeni, hiljentämällä Nrf2 ihmisen verisuonen endoteelisoluissa. Lisäksi on osoitettu kromatiini-immunopresipitaatiolla, että Nrf2 sitoutuu ATF4:n säätelyalueelle [54].

Yhteenveto

Tämän työn tarkoituksena on vetää yhteen nykytietämystä elektrofiilisten rasvahappojen roolista stressisignalointiteiden aktivoitumisessa. Kolme vastetta: Keap1-Nrf2, lämpöshokkivaste ja UPR, ovat pääasiallisesti itsenäisesti vaikuttavia signalointiteitä, jotka aktivoituvat samojen yhdisteiden vaikutuksesta ja osittain samankaltaisin mekanismein. Signalointiteiden välillä on yhteyksiä ja ne mahdollisesti hienosäätävät toinen toistensa toimintaa. Kaikilla on merkitystä inflammaatioprosesseissa, kuten ateroskleroosissa, mutta spesifisistä rasvahappoyhdisteistä, niiden muodostumisesta in vivo ja biologisen merkityksen tärkeydestä ei ole vielä muodostunut yhtenäistä käsitystä. Meidän ehdotuksemme on, että yksittäisen rasvahapon vaikutus voi olla vähäinen, mutta merkitykselliseksi nousee useiden toimijoiden samanaikainen ja samansuuntainen vaikutus usean signaalitien aktivaation kautta. Molekulaaristen mekanismien selvittäminen on tärkeää ja yksityiskohtien tuntemisen myötä voidaan löytää terapeutisia vaikutuskohtia, joiden kautta voidaan vaikuttaa signaaliteiden aktivoitumiseen tai hiljenemiseen. Tulevaisuudessa uudet biolääketieteen menetelmät, kuten massaspektrometria ja proteomiikka, toimivat merkittävinä työkaluina tutkittaessa elektrofiilisten rasvahappojen roolia solujen toiminnassa.

REFERENCES

- 1 Rudolph, T. K. and Freeman, B. A. (2009) Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. *Sci. Signal.* 2, re7. doi:10.1126/scisignal.290re7; 10.1126/scisignal.290re7
- 2 Winterbourn, C. C. and Hampton, M. B. (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 549-561. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004; 10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004
- 3 Bochkov, V. N., Philippova, M., Oskolkova, O., Kadl, A., Furnkranz, A., Karabeg, E., Afonyushkin, T., Gruber, F., Breuss, J., Minchenko, A., Mechtcheriakova, D., Hohensinner, P., Rychli, K., Wojta, J., Resink, T., Erne, P., Binder, B. R. and Leitinger, N. (2006) Oxidized phospholipids stimulate angiogenesis via autocrine mechanisms, implicating a novel role for lipid oxidation in the evolution of atherosclerotic lesions. *Circ. Res.* 99, 900-908. doi:10.1161/01.RES.0000245485.04489.ee
- 4 Bochkov, V. N., Oskolkova, O. V., Birukov, K. G., Levonen, A. L., Binder, C. J. and Stockl, J. (2010) Generation and biological activities of oxidized phospholipids. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 1009-1059. doi:10.1089/ars.2009.2597
- 5 Kansanen, E., Kivela, A. M. and Levonen, A. L. (2009) Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1310-1317. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.030
- 6 Gargalovic, P. S., Gharavi, N. M., Clark, M. J., Pagnon, J., Yang, W. P., He, A., Truong, A., Baruch-Oren, T., Berliner, J. A., Kirchgessner, T. G. and Luscis, A. J. (2006) The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2490-2496. doi:10.1161/01.ATV.0000242903.41158.a1
- 7 Oskolkova, O. V., Afonyushkin, T., Leitner, A., von Schlieffen, E., Gargalovic, P. S., Luscis, A. J., Binder, B. R. and Bochkov, V. N. (2008) ATF4-dependent transcription is a key mechanism in VEGF up-regulation by

oxidized phospholipids: Critical role of oxidized sn-2 residues in activation of unfolded protein response. *Blood*. 112, 330-339. doi:10.1182/blood-2007-09-112870

8 Jyrkkanen, H. K., Kansanen, E., Inkala, M., Kivela, A. M., Hurttila, H., Heinonen, S. E., Goldsteins, G., Jauhiainen, S., Tiainen, S., Makkonen, H., Oskolkova, O., Afonyushkin, T., Koistinaho, J., Yamamoto, M., Bochkov, V. N., Yla-Herttuala, S. and Levonen, A. L. (2008) Nrf2 regulates antioxidant gene expression evoked by oxidized phospholipids in endothelial cells and murine arteries in vivo. *Circ. Res.* 103, e1-9. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.176883

9 Navab, M., Ananthramaiah, G. M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., Ansell, B. J., Fonarow, G. C., Vahabzadeh, K., Hama, S., Hough, G., Kamranpour, N., Berliner, J. A., Lusis, A. J. and Fogelman, A. M. (2004) The oxidation hypothesis of atherogenesis: The role of oxidized phospholipids and HDL. *J. Lipid Res.* 45, 993-1007. doi:10.1194/jlr.R400001-JLR200

10 Napoli, C., D'Armiento, F. P., Mancini, F. P., Postiglione, A., Witztum, J. L., Palumbo, G. and Palinski, W. (1997) Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 100, 2680-2690. doi:10.1172/JCI119813

11 Freeman, B. A., Baker, P. R., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Napolitano, A. and d'Ischia, M. (2008) Nitro-fatty acid formation and signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 15515-15519. doi:10.1074/jbc.R800004200; 10.1074/jbc.R800004200

12 Rudolph, V., Rudolph, T. K., Schopfer, F. J., Bonacci, G., Woodcock, S. R., Cole, M. P., Baker, P. R., Ramani, R. and Freeman, B. A. (2010) Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 85, 155-166. doi:10.1093/cvr/cvp275

13 Ogura, T., Tong, K. I., Mio, K., Maruyama, Y., Kurokawa, H., Sato, C. and Yamamoto, M. (2010) Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2842-2847. doi:10.1073/pnas.0914036107; 10.1073/pnas.0914036107

14 Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D. and Yamamoto, M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13, 76-86

15 Kansanen, E., Bonacci, G., Schopfer, F. J., Kuosmanen, S. M., Tong, K. I., Leinonen, H., Woodcock, S. R., Yamamoto, M., Carlberg, C., Yla-Herttuala, S., Freeman, B. A. and Levonen, A. L. (2011) Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 286, 14019-14027. doi:10.1074/jbc.M110.190710

16 Levonen, A. L., Landar, A., Ramachandran, A., Ceaser, E. K., Dickinson, D. A., Zanoni, G., Morrow, J. D. and Darley-Usmar, V. M. (2004) Cellular mechanisms of redox cell signalling: Role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem. J.* 378, 373-382. doi:10.1042/BJ20031049

- 17 Zhang, D. D. and Hannink, M. (2003) Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8137-8151
- 18 Eggler, A. L., Liu, G., Pezzuto, J. M., van Breemen, R. B. and Mesecar, A. D. (2005) Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10070-10075. doi:10.1073/pnas.0502402102
- 19 Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. (1997) An Nrf2/small maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313-322
- 20 Kensler, T. W., Wakabayashi, N. and Biswal, S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 89-116. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046
- 21 Lee, J. M., Calkins, M. J., Chan, K., Kan, Y. W. and Johnson, J. A. (2003) Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J. Biol. Chem.* 278, 12029-12038. doi:10.1074/jbc.M211558200
- 22 Presterla, T., Holtzclaw, W. D., Zhang, Y. and Talalay, P. (1993) Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2965-2969
- 23 Itoh, K., Mimura, J. and Yamamoto, M. (2010) Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: A historical overview. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1665-1678. doi:10.1089/ars.2010.3222; 10.1089/ars.2010.3222
- 24 Kobayashi, M., Li, L., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Kaneko, H., Nakayama, Y., Eguchi, M., Wada, Y., Kumagai, Y. and Yamamoto, M. (2009) The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol. Cell. Biol.* 29, 493-502. doi:10.1128/MCB.01080-08
- 25 Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H. and Yamamoto, M. (2008) Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2758-2770. doi:10.1128/MCB.01704-07; 10.1128/MCB.01704-07
- 26 Eggler, A. L., Small, E., Hannink, M. and Mesecar, A. D. (2009) Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1. *Biochem. J.* 422, 171-180. doi:10.1042/BJ20090471
- 27 Kobayashi, A., Kang, M. I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K. and Yamamoto, M. (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7130-7139. doi:10.1128/MCB.24.16.7130-7139.2004
- 28 Tong, K. I., Padmanabhan, B., Kobayashi, A., Shang, C., Hirotsu, Y., Yokoyama, S. and Yamamoto, M. (2007) Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7511-7521. doi:10.1128/MCB.00753-07

- 29 Zhang, D. D., Lo, S. C., Cross, J. V., Templeton, D. J. and Hannink, M. (2004) Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10941-10953. doi:10.1128/MCB.24.24.10941-10953.2004
- 30 Sun, Z., Zhang, S., Chan, J. Y. and Zhang, D. D. (2007) Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6334-6349. doi:10.1128/MCB.00630-07
- 31 Zhang, D. D., Lo, S. C., Sun, Z., Habib, G. M., Lieberman, M. W. and Hannink, M. (2005) Ubiquitination of Keap1, a BTB-kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 30091-30099. doi:10.1074/jbc.M501279200
- 32 Bloom, D. A. and Jaiswal, A. K. (2003) Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:Quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 278, 44675-44682. doi:10.1074/jbc.M307633200
- 33 Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J. and Diehl, J. A. (2003) Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7198-7209
- 34 Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K. B., Awuh, J. A., Overvatn, A., McMahon, M., Hayes, J. D. and Johansen, T. (2010) p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J. Biol. Chem.* 285, 22576-22591. doi:10.1074/jbc.M110.118976
- 35 Akerfelt, M., Morimoto, R. I. and Sistonen, L. (2010) Heat shock factors: Integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 545-555. doi:10.1038/nrm2938
- 36 Anckar, J. and Sistonen, L. (2011) Regulation of HSF1 function in the heat stress response: Implications in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 1089-1115. doi:10.1146/annurev-biochem-060809-095203; 10.1146/annurev-biochem-060809-095203
- 37 Jacobs, A. T. and Marnett, L. J. (2007) Heat shock factor 1 attenuates 4-hydroxynonenal-mediated apoptosis: Critical role for heat shock protein 70 induction and stabilization of bcl-XL. *J. Biol. Chem.* 282, 33412-33420. doi:10.1074/jbc.M706799200
- 38 Zingarelli, B., Hake, P. W., Mangeshkar, P., O'Connor, M., Burroughs, T. J., Piraino, G., Denenberg, A. and Wong, H. R. (2007) Diverse cardioprotective signaling mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and ciglitazone, in reperfusion injury: Role of nuclear factor-kappaB, heat shock factor 1, and akt. *Shock.* 28, 554-563. doi:10.1097/shk.0b013e31804f56b9
- 39 Kansanen, E., Jyrkkanen, H. K., Volger, O. L., Leinonen, H., Kivela, A. M., Hakkinen, S. K., Woodcock, S. R., Schopfer, F. J., Horrevoets, A. J., Yla-Herttuala, S., Freeman, B. A. and Levonen, A. L. (2009) Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: Identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. *J. Biol. Chem.* 284, 33233-33241. doi:10.1074/jbc.M109.064873

- 40 Vila, A., Tallman, K. A., Jacobs, A. T., Liebler, D. C., Porter, N. A. and Marnett, L. J. (2008) Identification of protein targets of 4-hydroxynonenal using click chemistry for ex vivo biotinylation of azido and alkynyl derivatives. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 432-444. doi:10.1021/tx700347w; 10.1021/tx700347w
- 41 Trinklein, N. D., Murray, J. I., Hartman, S. J., Botstein, D. and Myers, R. M. (2004) The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol. Biol. Cell.* 15, 1254-1261. doi:10.1091/mbc.E03-10-0738
- 42 Niture, S. K. and Jaiswal, A. K. (2010) Hsp90 interaction with INrf2(Keap1) mediates stress-induced Nrf2 activation. *J. Biol. Chem.* 285, 36865-36875. doi:10.1074/jbc.M110.175802
- 43 Kaitsuka, T., Tomizawa, K. and Matsushita, M. (2011) Transformation of eEF1Bdelta into heat-shock response transcription factor by alternative splicing. *EMBO Rep.* 12, 673-681. doi:10.1038/embor.2011.82; 10.1038/embor.2011.82
- 44 Ron, D. and Walter, P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519-529. doi:10.1038/nrm2199
- 45 Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D. F., Bell, J. C., Hettmann, T., Leiden, J. M. and Ron, D. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell.* 11, 619-633
- 46 Fawcett, T. W., Martindale, J. L., Guyton, K. Z., Hai, T. and Holbrook, N. J. (1999) Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem. J.* 339 (Pt 1), 135-141
- 47 Gargalovic, P. S., Imura, M., Zhang, B., Gharavi, N. M., Clark, M. J., Pagnon, J., Yang, W. P., He, A., Truong, A., Patel, S., Nelson, S. F., Horvath, S., Berliner, J. A., Kirchgessner, T. G. and Lusis, A. J. (2006) Identification of inflammatory gene modules based on variations of human endothelial cell responses to oxidized lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12741-12746. doi:10.1073/pnas.0605457103
- 48 West, J. D. and Marnett, L. J. (2005) Alterations in gene expression induced by the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1642-1653. doi:10.1021/tx050211n
- 49 Gharavi, N. M., Gargalovic, P. S., Chang, I., Araujo, J. A., Clark, M. J., Szeto, W. L., Watson, A. D., Lusis, A. J. and Berliner, J. A. (2007) High-density lipoprotein modulates oxidized phospholipid signaling in human endothelial cells from proinflammatory to anti-inflammatory. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1346-1353. doi:10.1161/ATVBAHA.107.141283
- 50 Gugiu, B. G., Mouillesseaux, K., Duong, V., Herzog, T., Hekimian, A., Koroniak, L., Vondriska, T. M. and Watson, A. D. (2008) Protein targets of oxidized phospholipids in endothelial cells. *J. Lipid Res.* 49, 510-520. doi:10.1194/jlr.M700264-JLR200
- 51 Feng, B., Yao, P. M., Li, Y., Devlin, C. M., Zhang, D., Harding, H. P., Sweeney, M., Rong, J. X., Kuriakose, G., Fisher, E. A., Marks, A. R., Ron, D. and Tabas, I. (2003) The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat. Cell Biol.* 5, 781-792. doi:10.1038/ncb1035

- 52 Sabatini, K., Mattila, J. P., Megli, F. M. and Kinnunen, P. K. (2006) Characterization of two oxidatively modified phospholipids in mixed monolayers with DPPC. *Biophys. J.* 90, 4488-4499. doi:10.1529/biophysj.105.080176
- 53 Guo, L., Chen, Z., Cox, B. E., Amarnath, V., Epanand, R. F., Epanand, R. M. and Davies, S. S. (2011) Phosphatidylethanolamines modified by γ -ketoaldehyde (γ KA) induce endoplasmic reticulum stress and endothelial activation. *J. Biol. Chem.* . doi:10.1074/jbc.M110.213470
- 54 Afonyushkin, T., Oskolkova, O. V., Philippova, M., Resink, T. J., Erne, P., Binder, B. R. and Bochkov, V. N. (2010) Oxidized phospholipids regulate expression of ATF4 and VEGF in endothelial cells via NRF2-dependent mechanism: Novel point of convergence between electrophilic and unfolded protein stress pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1007-1013. doi:10.1161/ATVBAHA.110.204354