

Prof. Giorgio Sartor

Specie radicaliche e stress ossidativo

Copyright © 2001-2012 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

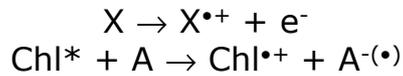
Versione 4.2 - nov 2012

Radicali

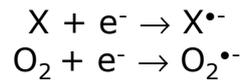
- Specie chimiche con elettroni spaiati
 - occupano da soli un orbitale atomico o molecolare
- Molto instabili e reattivi verso le altre molecole per compensare tale squilibrio
- Autopropagazione per reazioni a catena
- Pericolosità inversamente proporzionale all'emivita

Meccanismi di formazione di radicali

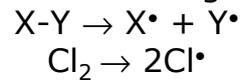
- Perdita di un elettrone:



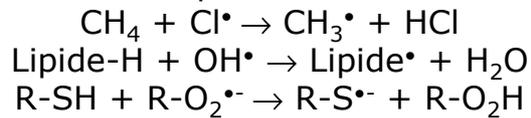
- Acquisto di un elettrone:



- Scissione omolitica di un legame covalente:



- Astrazione di un atomo di idrogeno (H[•]) da parte di un'altra specie radicalica:



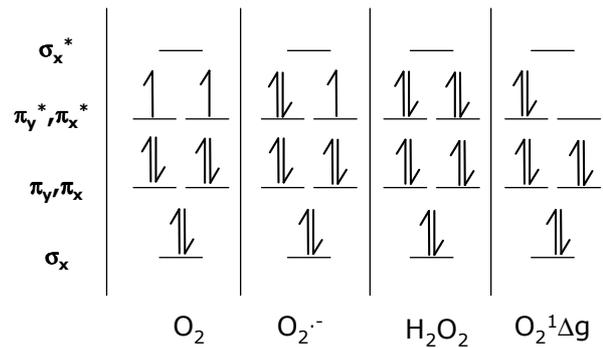
gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

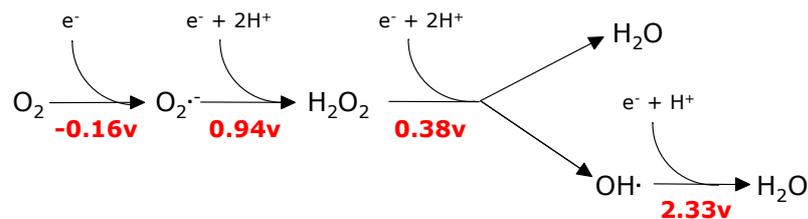
- 3 -

Ossigeno

- Orbitali molecolari dell'ossigeno



- Potenziali di riduzione



gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 4 -

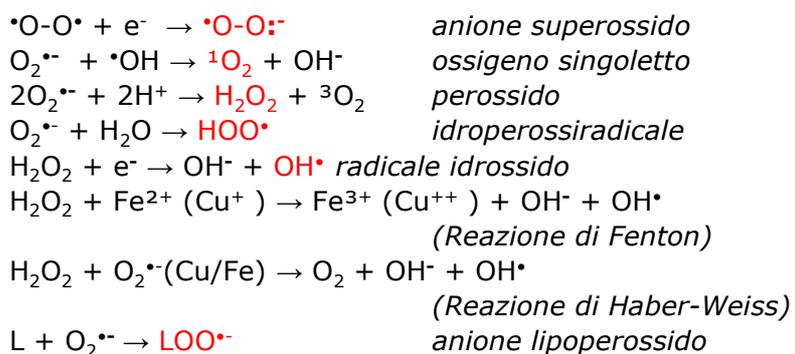
Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

- Specie non radicaliche

H_2O_2	<i>acqua ossigenata (perossido di idrogeno)</i>
HOBr	<i>acido ipobromoso</i>
HOCl	<i>acido ipocloroso</i>
O_3	<i>ozono</i>
$O_2 \ ^1\Delta_g$	<i>ossigeno singoletto</i>
LOOH	<i>perossido lipidico</i>
ONOOH	<i>perossinitrito</i>

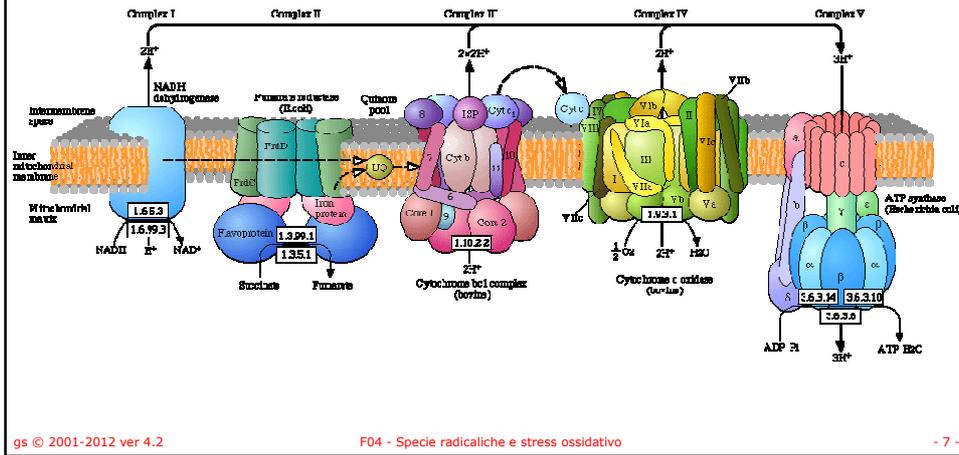
Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

- Radicali prodotti per riduzione ad un elettrone



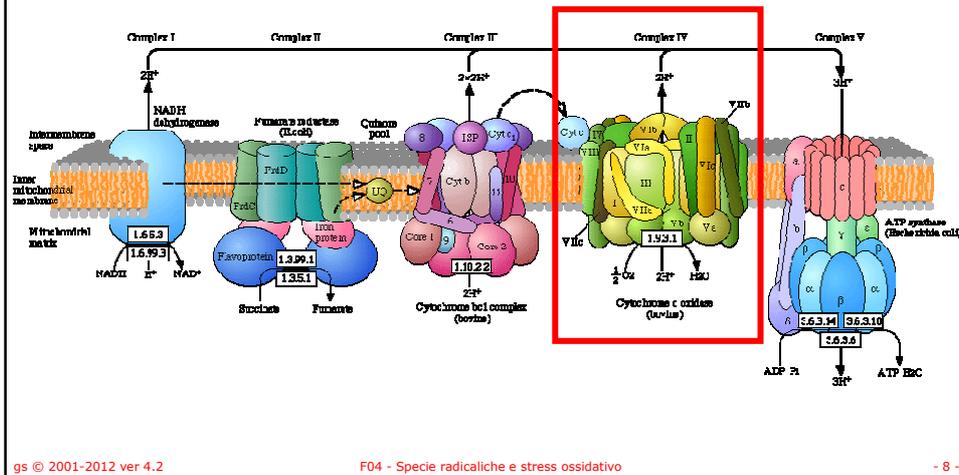
Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

- Prodotte dalla catena respiratoria

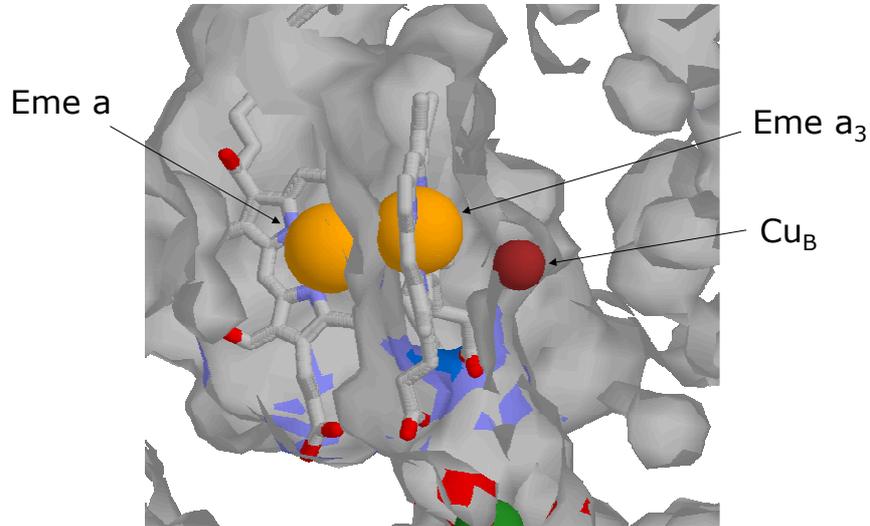


Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

- Prodotte dalla catena respiratoria nel complesso IV



Complesso IV

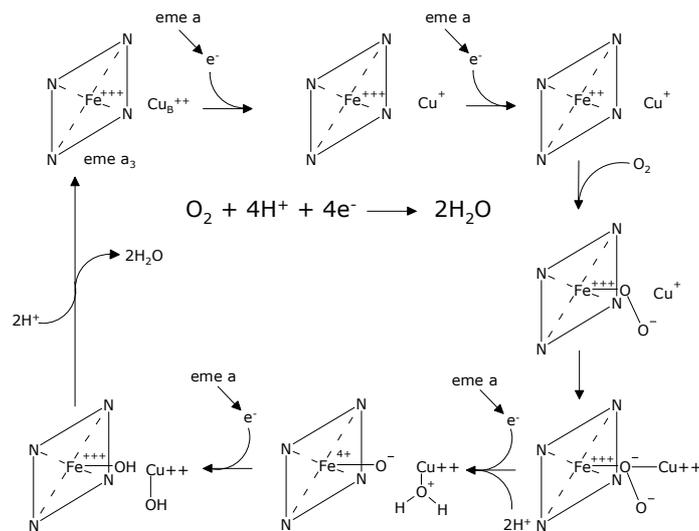


gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 9 -

Formazione di H₂O nel complesso IV

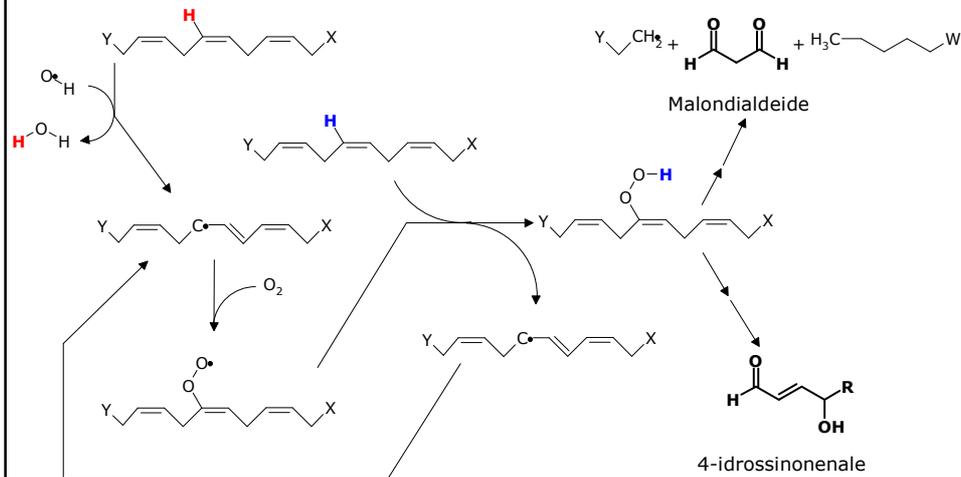


gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 10 -

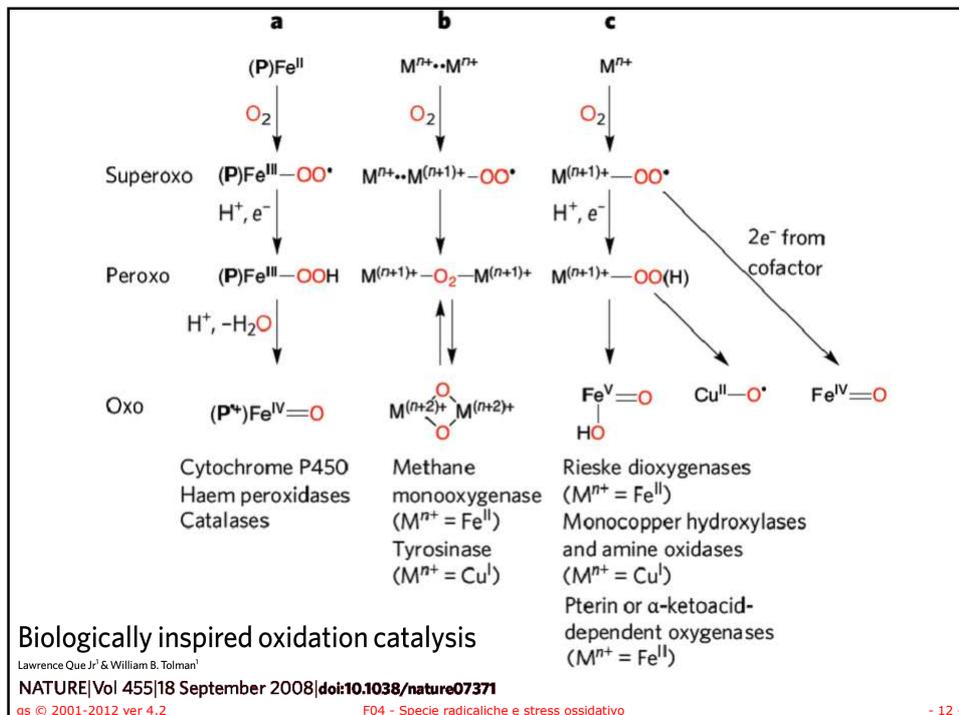
Lipoperossidi



gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 11 -



gs © 2001-2012 ver 4.2

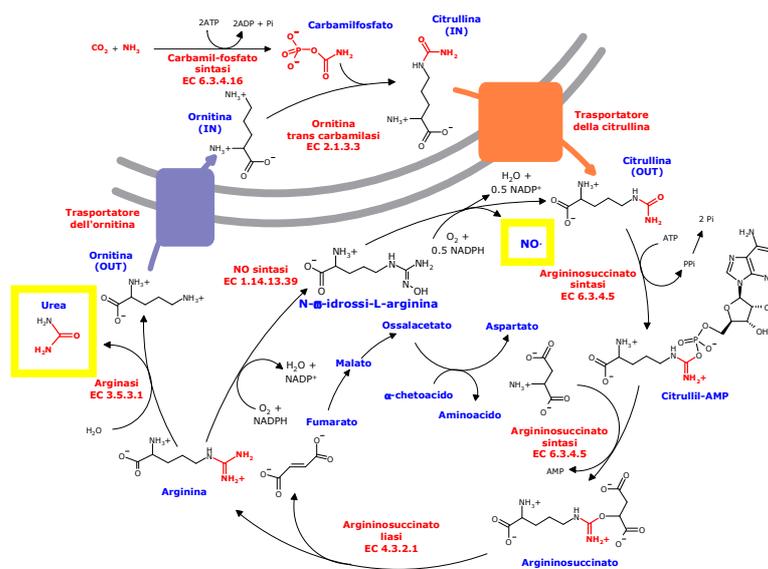
F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 12 -

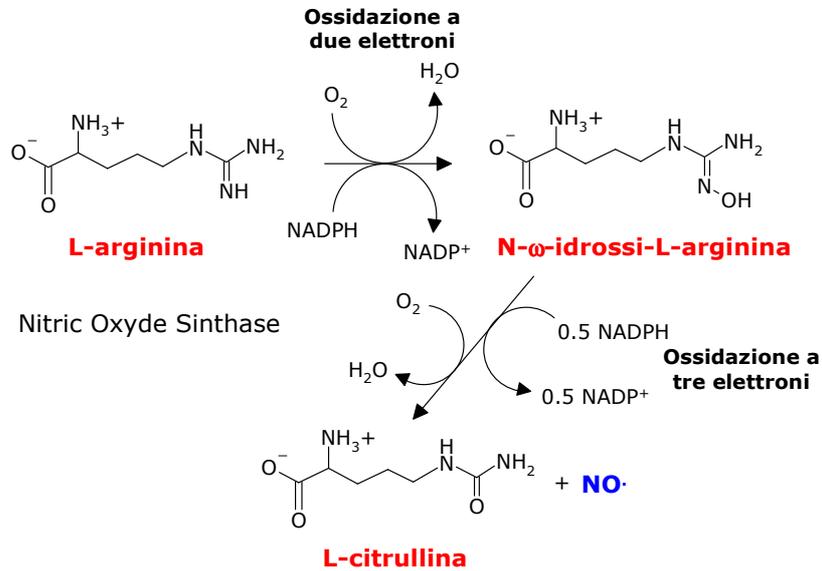
Specie Reattive dell'Azoto (RNS)

- Prodotti prevalentemente dallo smog fotochimico
- Specie non radicaliche
 - HNO_2 *acido nitroso*
 - NO^+ *catione nitrosile*
 - NO^- *anione nitrosile*
 - N_2O_4 *tetrossido di diazoto*
 - N_2O_3 *triossido di diazoto*
 - NO_2^+ *nitrile*
 - ROONO *alchilperossinitrito*
 - NO_2Cl *cloruro di nitrile*
- Specie radicaliche
 - $\text{O}_2 + \text{L-arginina} \rightarrow \text{NO}^\bullet + \text{L-citrullina}$ *ossido d'azoto*
 - $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{NO}^\bullet \rightarrow \text{ONOO}^-$ *perossinitrito*
 - $\text{ONOO}^- + \text{CO}_2 \rightarrow \text{ONOOCO}_2^-$ *nitroperossicarbonato*
 - $\text{ONOOCO}_2^- \rightarrow \text{NO}_2^\bullet + \text{CO}_3^{\bullet-}$ *biossido d'azoto*

Ciclo dell'urea e NO



Ossido d'azoto e NOS (EC 1.14.13.39)

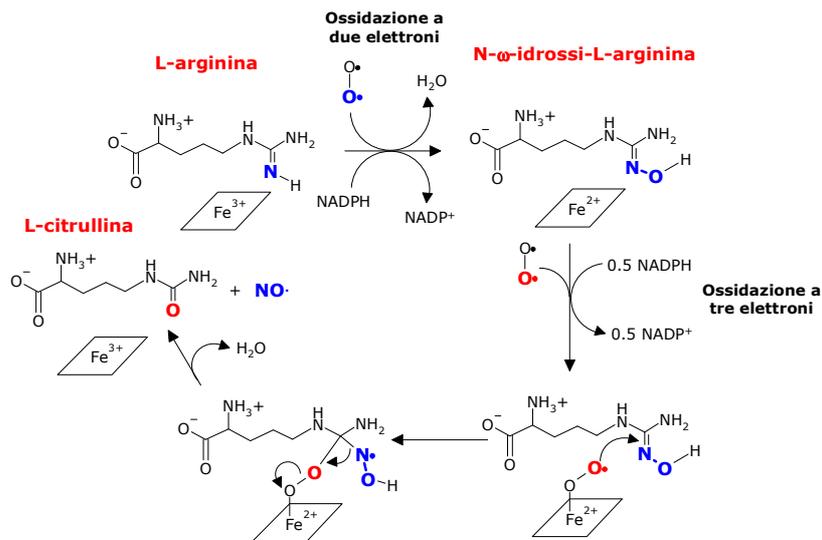


gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 15 -

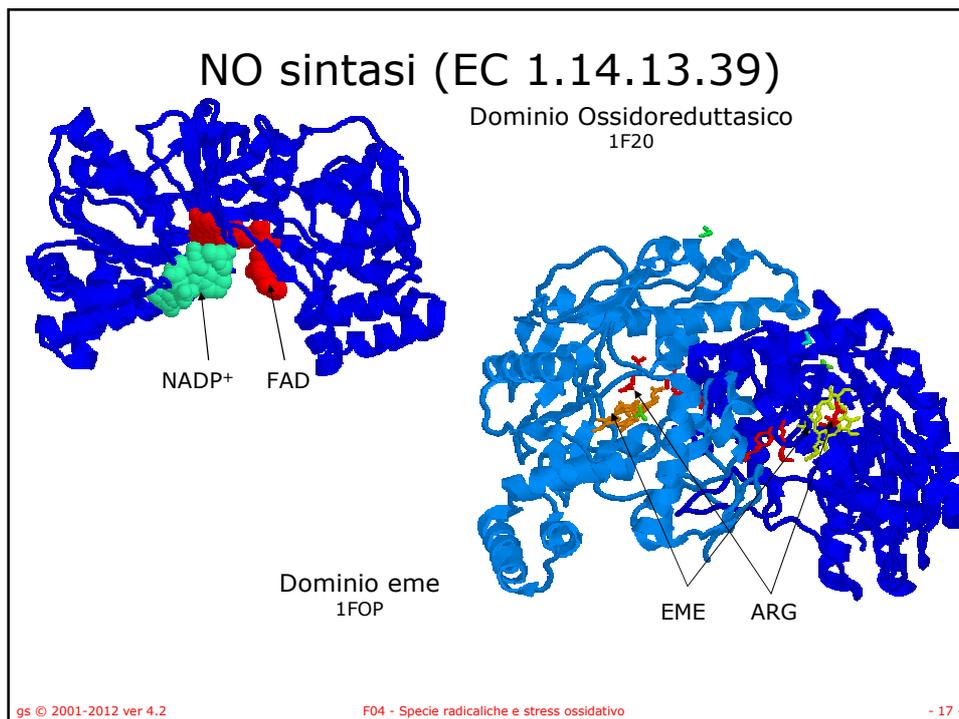
Ossido d'azoto e NOS (EC 1.14.13.39)



gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 16 -

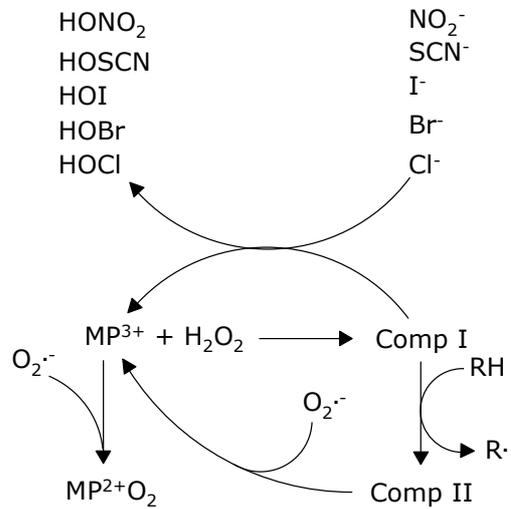


Specie reattive del cloro (RCS)

- Radicali
 - Cl•
- Non radicaliche
 - HOCl acido ipocloroso (ROS)
 - NO₂Cl cloruro di nitrile (RNS)
 - Cloramine
 - Cl₂ cloro

Mieloperossidasi (EC 1.11.1.7)

- La mieloperossidasi (MP³⁺) è un enzima perossidasi presente nei granuli dei neutrofili.
- Si ritiene che produca HOCl nei fagosomi.
- Può usare anche altri ioni oltre il cloruro.

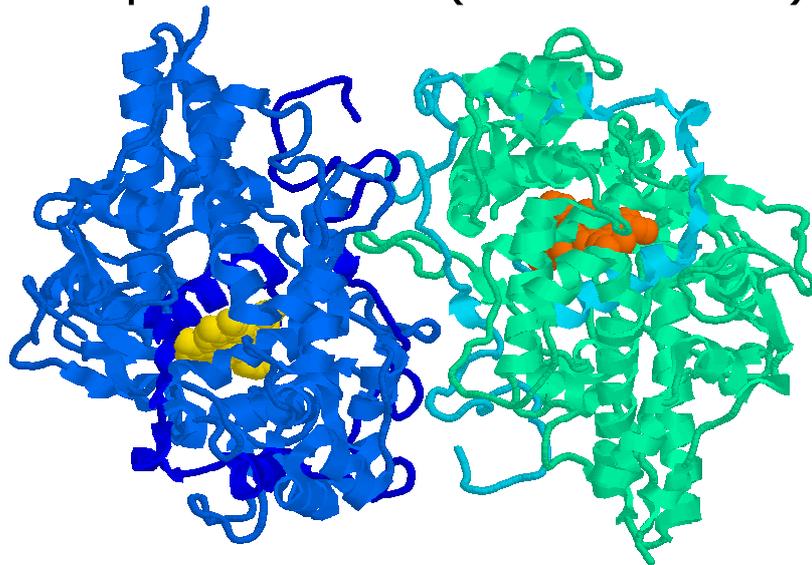


gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 19 -

Mieloperossidasi (EC 1.11.1.7)



gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 20 -

Stabilità dei radicali

RADICALE		TEMPO DI VITA
Radicale idrossido	$\cdot\text{OH}$	10^{-9} s
Radicale alcossido	$\cdot\text{OR}$	10^{-6} s
Ossigeno singoletto	$^1\text{O}_2$	10^{-5} s
Anione perossinitrito	ONOO^-	0.05-1.0 s
Ossido di azoto	$\cdot\text{NO}$	1-10 s
Radicale perossido	$\text{ROO}\cdot$	7 s
Anione superossido	$\text{O}_2^{\cdot-}$	10^3 - 10^4 s

gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 21 -

Sorgenti di Radicali

- Endogene:
 - Catena respiratoria,
 - Fotosintesi,
 - Sintesi di prostaglandine,
 - Metabolismo dei nucleotidi
 - Perossisomi,
 - Autossidazione,
 - Fagocitosi,
 - Ossiemoglobina,
 - Enzimi ossidativi...
- Esogene:
 - Xenobiotici,
 - Radiazioni
 - Ionizzanti (raggi X)
 - Non ionizzanti (UV)
 - Calore,
 - Infezione,
 - Iperossia,
 - Inquinamento

gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 22 -

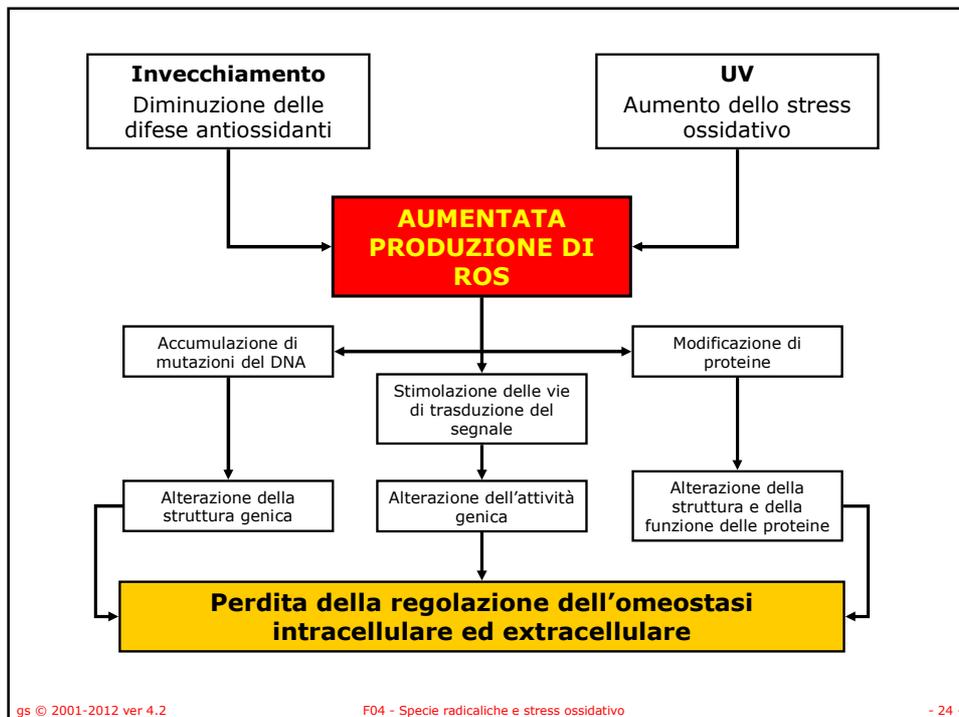
Sorgenti di Radicali

- Endogene:
 - Catena respiratoria,
 - Fotosintesi,
 - Sintesi di prostaglandine,
 - Metabolismo dei nucleotidi
 - Perossisomi,
 - Autossidazione,
 - Fagocitosi,
 - Ossiemoglobina,
 - Enzimi ossidativi...
- Esogene:
 - ❖ **Xenobiotici**,
 - Radiazioni
 - Ionizzanti (raggi X)
 - Non ionizzanti (UV)
 - Calore,
 - Infezione,
 - Iperossia,
 - ❖ **Inquinamento**

gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

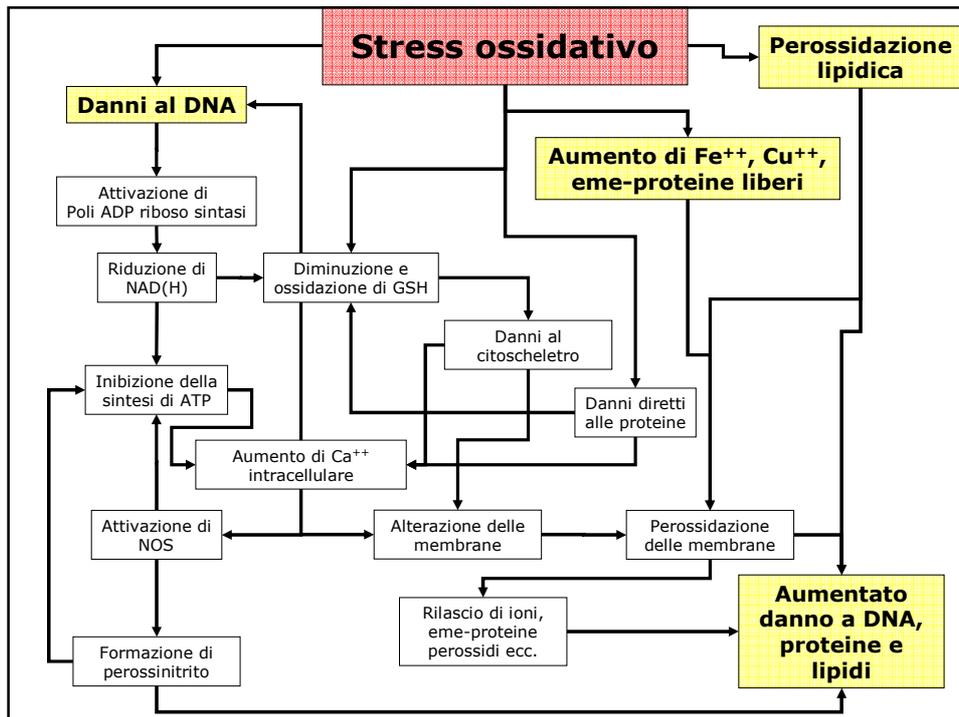
- 23 -



gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 24 -



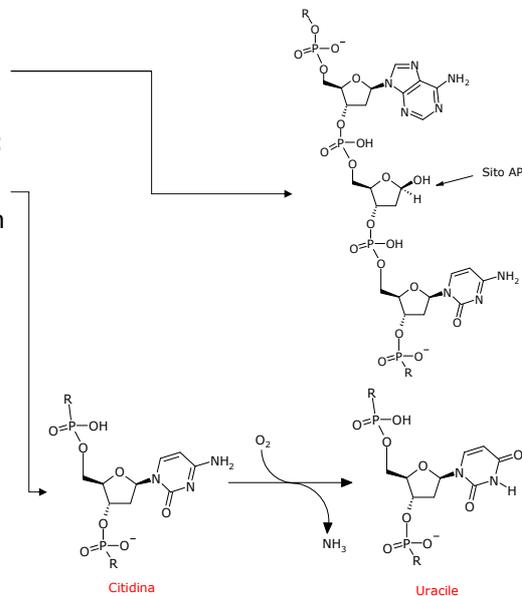
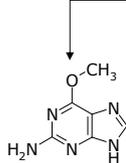
Danni al DNA

- Danni endogeni
 - ROS prodotti dal metabolismo, portano alla deaminazione ossidativa
- Danni esogeni da:
 - Radiazioni: UV (200-400 nm), Raggi X, Raggi γ
 - Idrolisi e degradazione termica
 - Tossine vegetali
 - Composti mutageni di origine antropica (intercalanti)
 - Virus

Tipi di danno

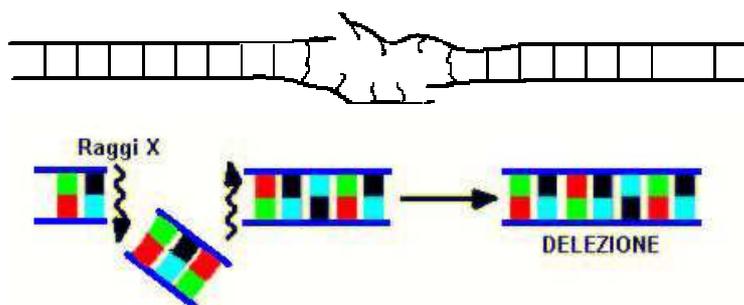
- Ossidazione delle basi: formazione di 8-osso-7,8-diidroguanine (8-oxoG)
- Alchilazione delle basi (in genere metilazione) con formazione di 7-metilguanina, 1-metiladenina, 6-O-Metilguanina
- Idrolisi delle basi (deaminazione, depurinazione e depirimidinazione)
- Formazioni di addotti con IPA e derivati
- Formazione di cross-link tra citosine e timine adiacenti formano dimeri di pirimidina da UV
- Depurinazione da temperatura

- Perdita di basi: il legame glicosidico è labile sotto condizione fisiologiche (formazione di un sito AP).
- Deaminazione ossidativa: i gruppi amminici primari sono a volte instabili e possono venire convertiti in chetoni.
- Metilazione con formazioni di O-metilderivati



Danni Fisici: Radiazioni Ionizzanti

- Danni diretti: *Single Strand Break*, *Double Strand Break*, *Mismatched bases*.
- Danni indiretti: produzione di ROS.



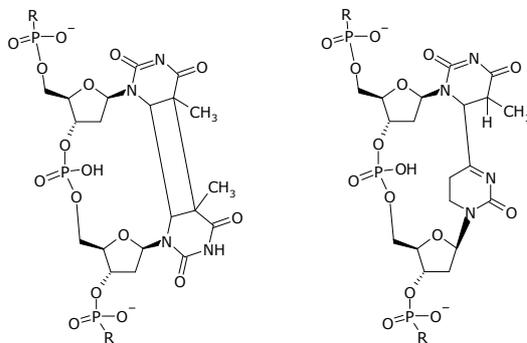
gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 29 -

Danni Fisici: Radiazioni UV

- Stress ossidativo: foto-carcinogenesi e foto-invecchiamento (UV-B)
- Foto-dimerizzazione: formazione di CPD e 6-4PP (UV-C).



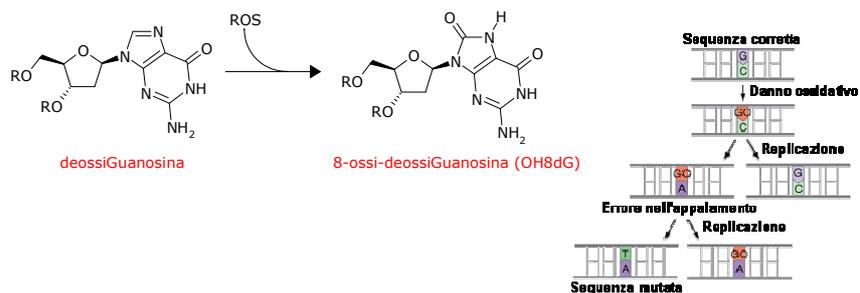
gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 30 -

Danni chimici: ROS

- Causano ossidazione delle basi e **amplificano** deamminazioni e depurinazioni.
 - o Un esempio di composto ossidato è OH8dG: causa trasversioni delle basi GC → TA



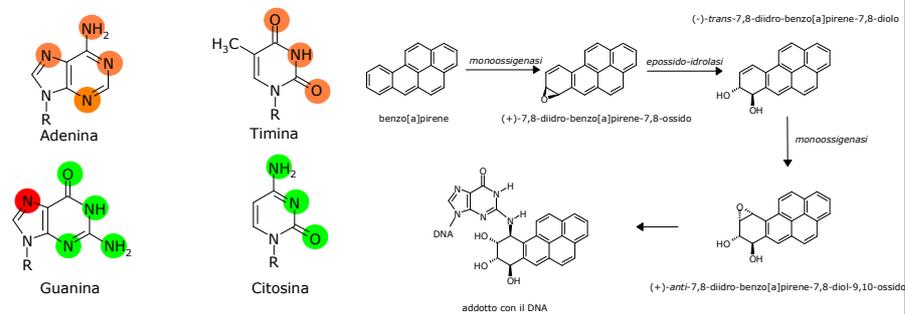
gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 31 -

Danni chimici: inquinanti Organici

- Genotossici: danno diretto al DNA tramite formazione di addotti (alchilanti in posizioni nucleofile).
- Epigenetici: danno indiretto al DNA attraverso stress ossidativo o l'attivazione di composti pericolosi. Es. IPA.



gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

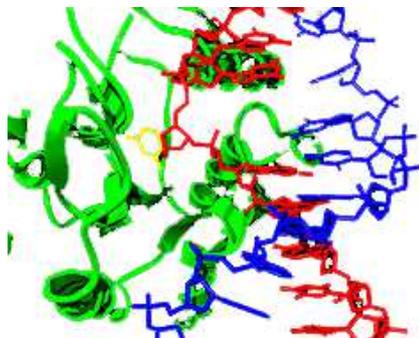
- 32 -

Riparazione del danno single-strand

- Enzimi di riparazione del danno Single-strand (Uracil-DNA glicosilasi EC 3.2.2.)
- Uso dell'altro strand come template
- Base excision repair (BER) rimuove il danno da alchilazione, ossidazione, idrolisi, deaminazione. La base danneggiata è rimossa da una DNA glicosidasi. La base mancante è risintetizzata da una DNA polimerasi e reinserita da una DNA ligasi
- Nucleotide excision repair (NER), riconosce distorsioni dell'elica come laformazioni di dimeri di pirimidina
- Mismatch Repair (MMR) corregge errori di replicazione e ricombinazione dovuti a errori nell'accoppiamento delle basi non danneggiate.

Uracil-DNA glicosilasi (EC 3.2.2.X)

- Ripara il danno ossidativo C → U

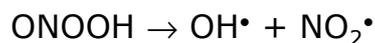


Riparazione del danno double-strand

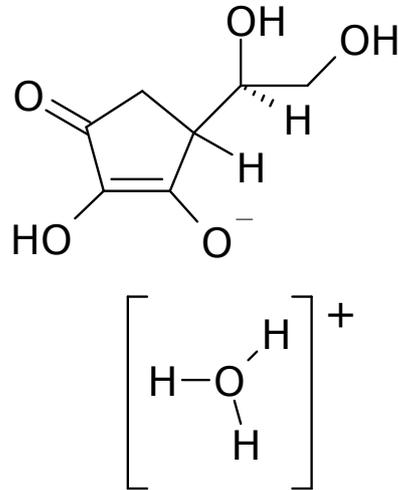
- Non-homologous end joining (NHEJ), microhomology-mediated end joining (MMEJ) e ricombinazione omologa
- L'enzima DNA ligasi ripristina il legame tra nucleotidi con la formazione di un legame estereo tra il fosfato e il nucleotide
- In NHEJ, DNA Ligasi IV, è una DNA ligasi specifica che forma un complesso con una proteina (XRCC4) che è coinvolta nelle interazione con i promotori.

Antiossidanti

- Gli antiossidanti non sono, in genere, dei radicali liberi. Quindi quando un antiossidante agisce si forma un radicale derivato dall'antiossidante.
- Se un radicale libero perde o guadagna un elettrone non è più un radicale libero:
$$\text{NO}^\bullet \rightarrow \text{e}^- + \text{NO}^+$$
$$\text{NO}^\bullet + \text{e}^- \rightarrow \text{NO}^-$$
- La reazione tra specie radicaliche porta alla perdita netta di radicali
$$\text{O}_2^{\bullet-} + \text{NO}^\bullet \rightarrow \text{ONOO}^-$$
- nello specifico lo ione perossinitrito può generare radicale idrossile.



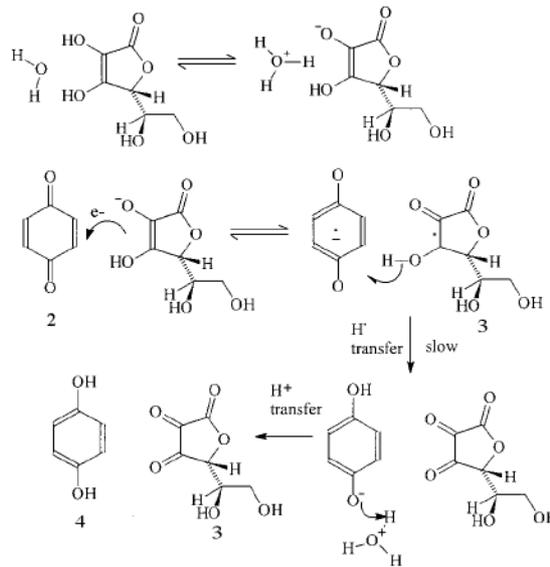
Acido ascorbico (Vit. C)



gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 37 -



Scheme 1

A mechanistic study of the reduction of quinones by ascorbic acid *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1997* 1465

gs © 2001-2012 ver 4.2

F04 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 38 -

Referenze sul WEB

- Vie metaboliche
 - KEGG: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
 - Degradazione degli xenobiotici: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01196.html>
- Struttura delle proteine:
 - Protein data bank (Brookhaven): <http://www.rcsb.org/pdb/>
 - Hexpasy
 - Expert Protein Analysis System: <http://us.expasy.org/sprot/>
 - Prosite (protein families and domains): <http://www.expasy.org/prosite/>
 - Enzyme (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
 - Scop (famiglie strutturali): <http://scop.berkeley.edu/>
- Enzimi:
 - Nomenclatura - IUBMB: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>
 - Proprietà - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
 - Expasy (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
- Database di biocatalisi e biodegradazione: <http://umbbd.ahc.umn.edu/>
- Citocromo P450: <http://www.icgeb.org/~p450srv/>
- Metallotioneine: <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>
- Tossicità degli xenobiotici: Agency for Toxic Substances and Disease Registry <http://www.atsdr.cdc.gov>

Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da:
<http://www.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>
- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor
Università di Bologna – Alma Mater

Giorgio Sartor - giorgio.sartor@unibo.it