

Prof. Giorgio Sartor

# Specie radicaliche e stress ossidativo



Copyright © 2001-2017 by Giorgio Sartor.  
All rights reserved.

Versione 4.6 – Feb-17

## 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

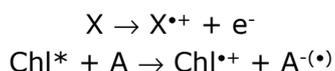
gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

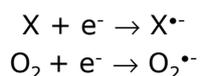
- 2 -

## Meccanismi di formazione di radicali

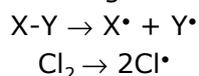
- Perdita di un elettrone:



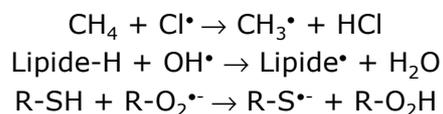
- Acquisto di un elettrone:



- Scissione omolitica di un legame covalente:



- Astrazione di un atomo di idrogeno (H<sup>•</sup>) da parte di un'altra specie radicalica:



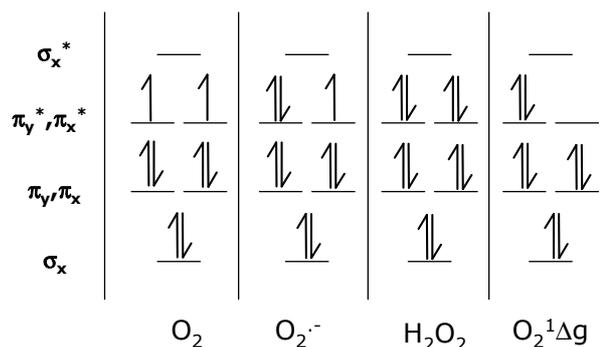
gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

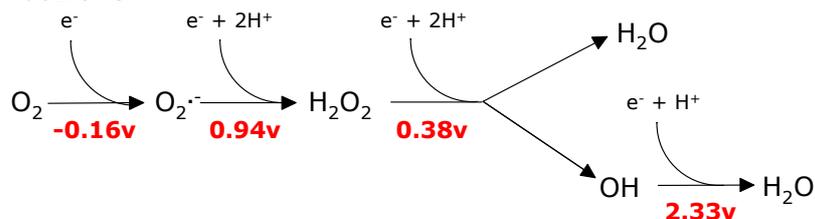
- 3 -

## Ossigeno

- Orbitali molecolari dell'ossigeno



- Potenziali di riduzione

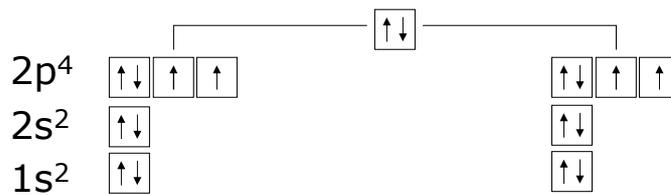
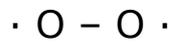


gs © 2001-2017 ver 4.6

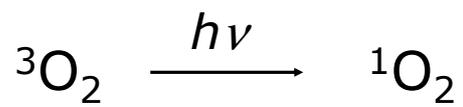
S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 4 -

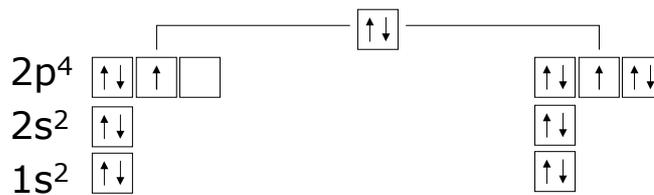
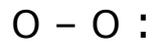
## Ossigeno tripletto



## Fornendo energia



## Ossigeno singoletto



## Fonti di Radicali

- Sorgenti endogene:
  - catena respiratoria, fotosintesi, prostaglandine, perossisomi, autossidazione, fagociti, ossiemoglobina, enzimi ossidativi
- Sorgenti esogene:
  - xenobiotici, radiazioni (ionizzanti e UV), calore, infezione, iperossia, inquinamento

## Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

- Specie non radicaliche

$H_2O_2$       *acqua ossigenata (perossido di idrogeno)*

$HOBr$       *acido ipobromoso*

$HOCl$       *acido ipocloroso*

$O_3$       *ozono*

$O_2 \ ^1\Delta_g$       *ossigeno singoletto*

$LOOH$       *perossido lipidico*

$ONOOH$       *perossinitrito*

## Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

- Radicali prodotti per riduzione ad un elettrone e loro reazioni

$\bullet O-O\bullet + e^- \rightarrow \bullet O-O\bullet^-$       *anione superossido (NADPH ossidasi)*

$O_2\bullet^- + \bullet OH \rightarrow \ ^1O_2 + OH^-$       *ossigeno singoletto*

$2O_2\bullet^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + \ ^3O_2$       *perossido*

$O_2\bullet^- + H_2O \rightarrow HOO\bullet$       *idroperossiradicale*

$H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^- + OH\bullet$       *radicale idrossido*

$L + O_2\bullet^- \rightarrow LOO\bullet^-$       *anione lipoperossido*

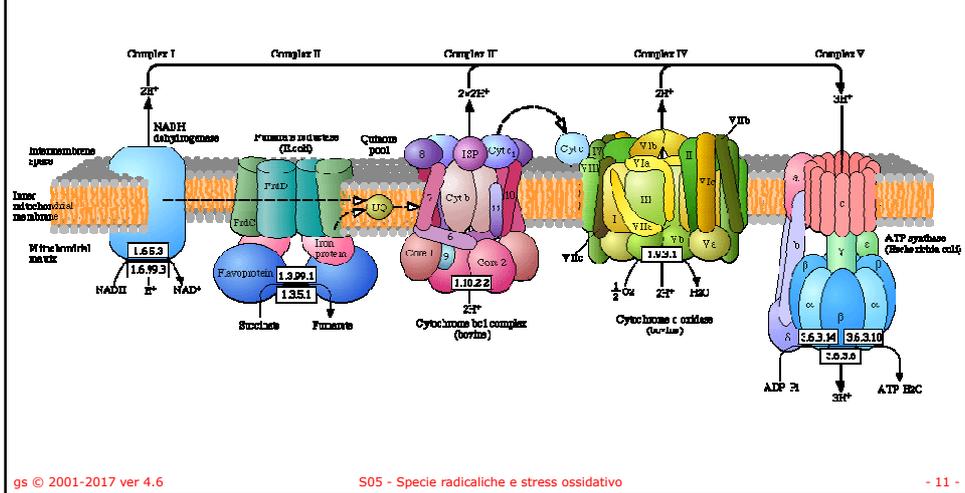
- Reazioni:

$H_2O_2 + Fe^{2+} (Cu^+) \rightarrow Fe^{3+} (Cu^{++}) + OH^- + OH\bullet$       *(Fenton)*

$H_2O_2 + O_2\bullet^-(Cu/Fe) \rightarrow O_2 + OH^- + OH\bullet$       *(Haber-Weiss)*

# Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

- Prodotte dalla catena respiratoria



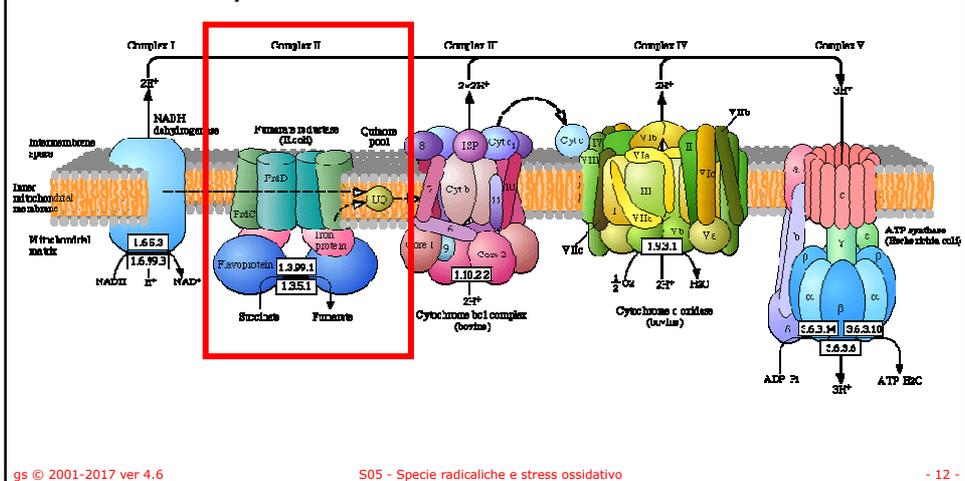
gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 11 -

# Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

- Prodotte dalla catena respiratoria nel complesso II

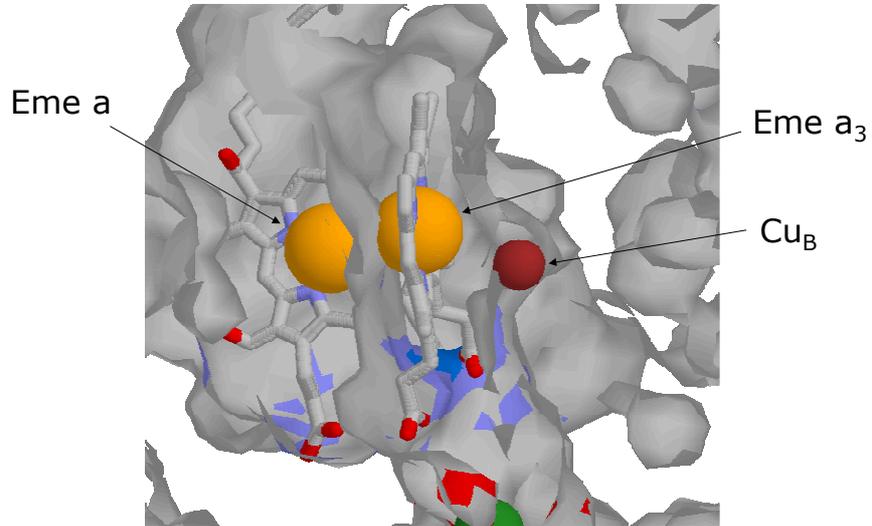


gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 12 -

# Complesso IV

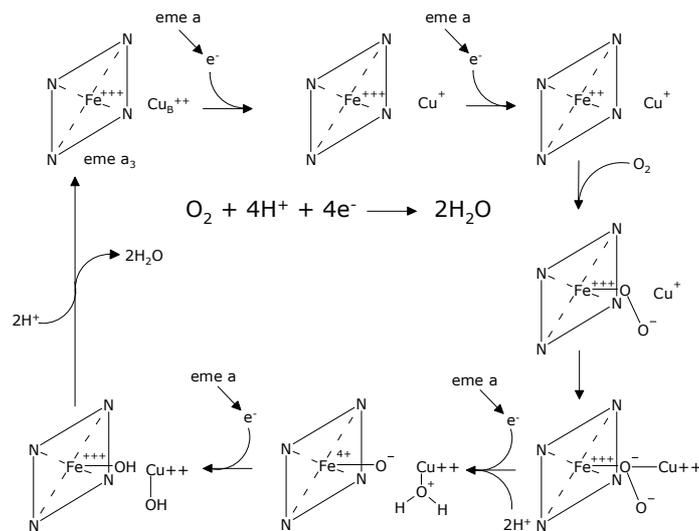


gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 13 -

# Formazione di H<sub>2</sub>O nel complesso IV

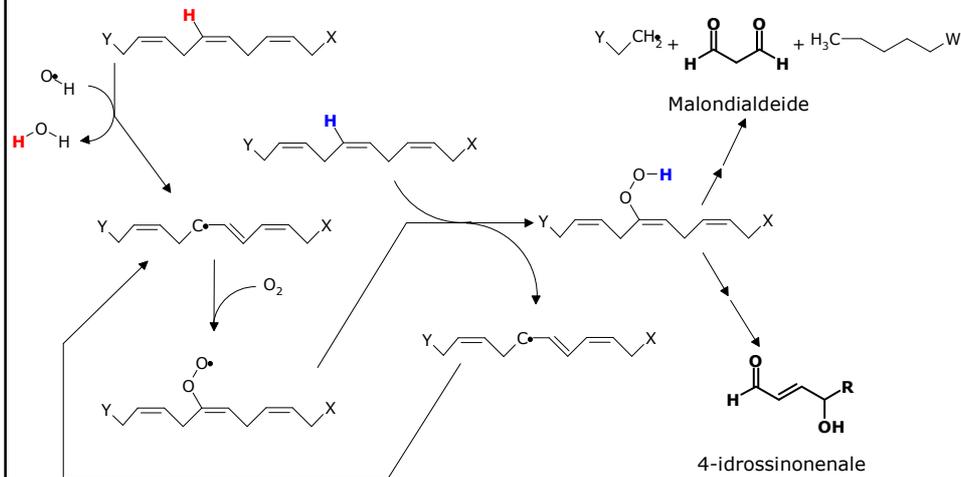


gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 14 -

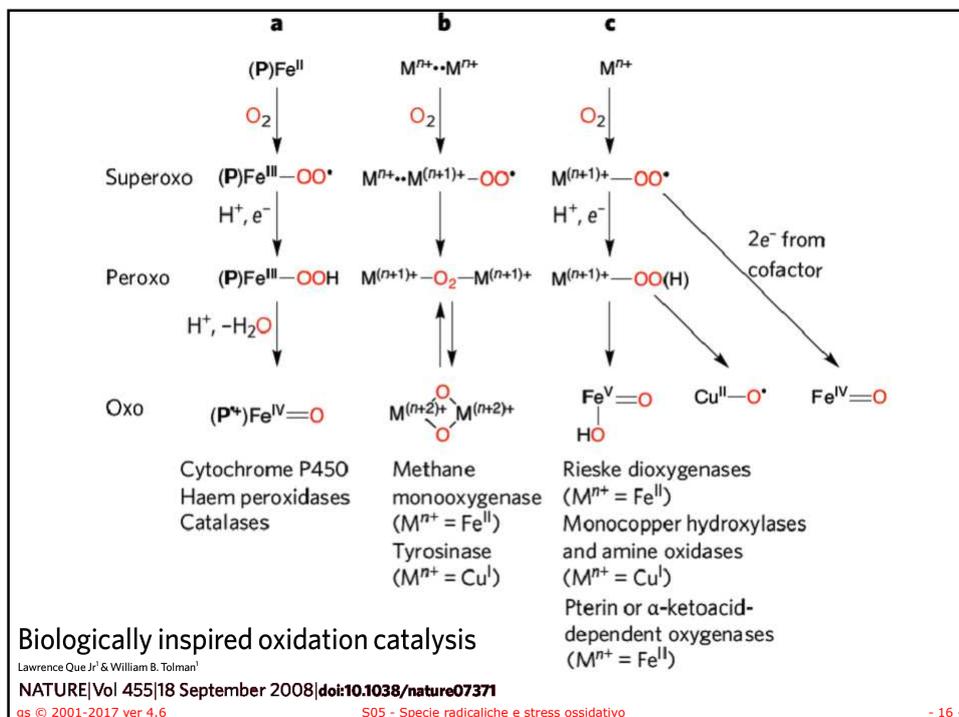
# Lipoperossidi



gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 15 -



gs © 2001-2017 ver 4.6

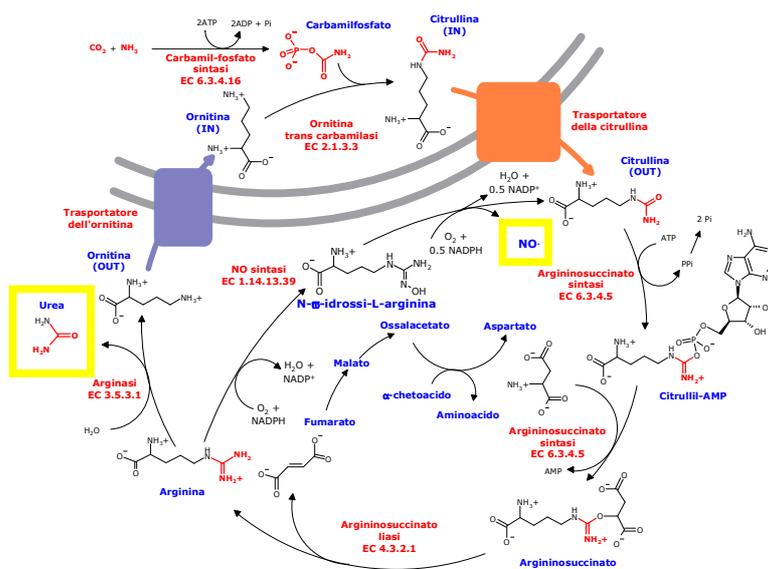
S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 16 -

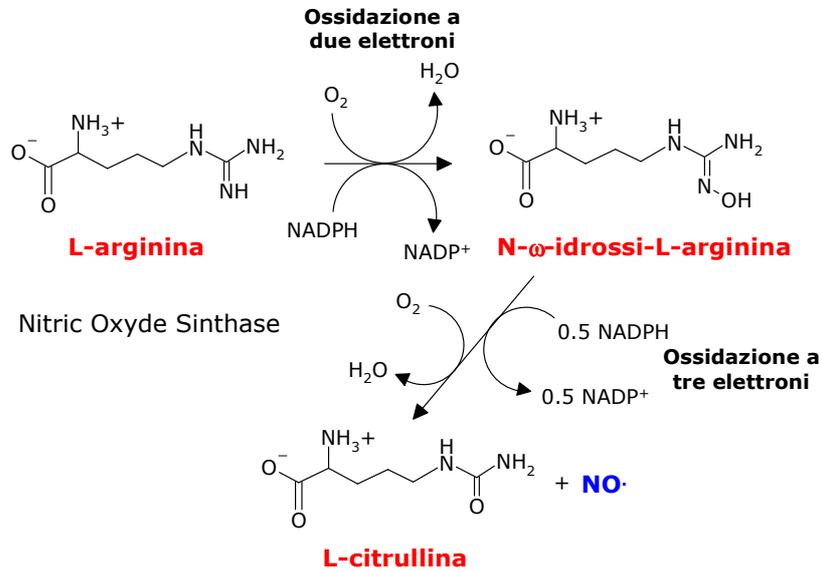
## Specie Reattive dell'Azoto (RNS)

- Prodotti prevalentemente dallo smog fotochimico
- Specie non radicaliche
  - $\text{HNO}_2$  *acido nitroso*
  - $\text{NO}^+$  *catione nitrosile*
  - $\text{NO}^-$  *anione nitrosile*
  - $\text{N}_2\text{O}_4$  *tetrossido di diazoto*
  - $\text{N}_2\text{O}_3$  *triossido di diazoto*
  - $\text{NO}_2^+$  *nitrile*
  - $\text{ROONO}$  *alchilperossinitrito*
  - $\text{NO}_2\text{Cl}$  *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 )

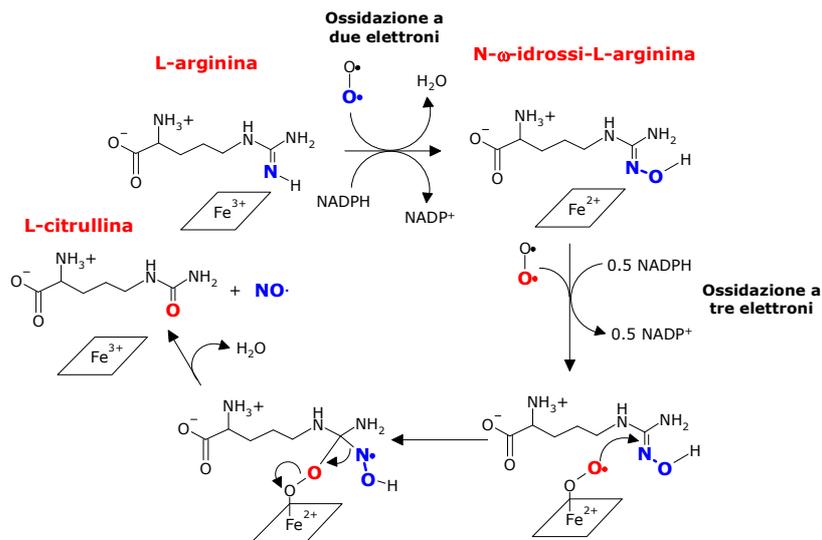


gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 19 -

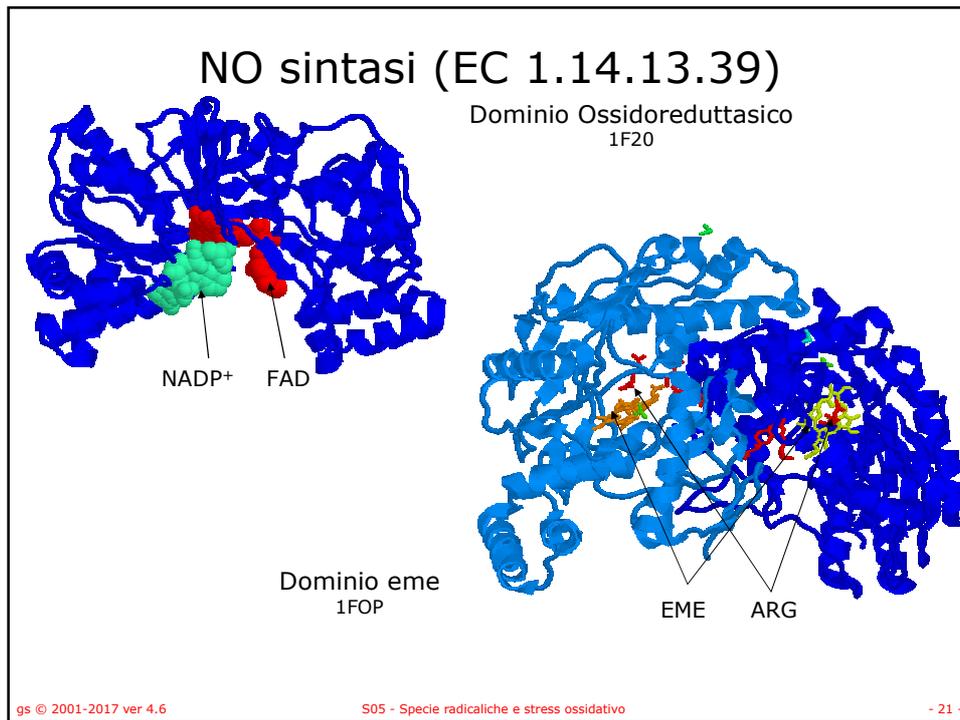
## Ossido d'azoto e NOS (EC 1.14.13.39 )



gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 20 -

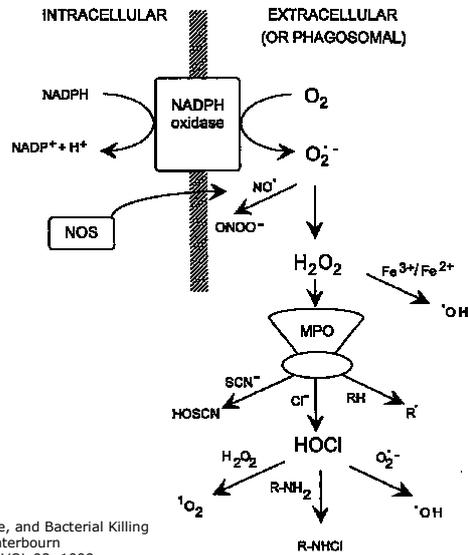


## Specie reattive del cloro (RCS)

- Radicali
  - Cl•
- Non radicaliche
  - HOCl acido ipocloroso (ROS)
  - NO<sub>2</sub>Cl cloruro di nitrile (RNS)
  - Cloramine
  - Cl<sub>2</sub> cloro

## Mieloperossidasi (EC 1.11.1.7)

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



Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing  
By Mark B. Hampton, Anthony J. Kettle, and Christine C. Winterbourn  
BLOOD The Journal of The American Society of Hematology, VOL 92, 1998

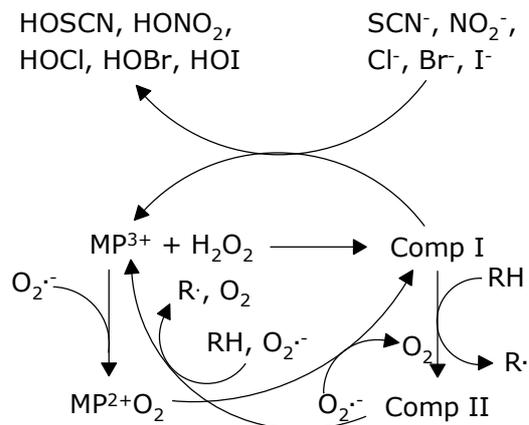
gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 23 -

## Mieloperossidasi (EC 1.11.1.7)

- La mieloperossidasi (MP<sup>3+</sup>) è un enzima perossidasi presente nei granuli dei neutrofili (lisosomi).
- Si ritiene che produca HOCl nei fagosomi.
- Può usare anche altri ioni oltre il cloruro.



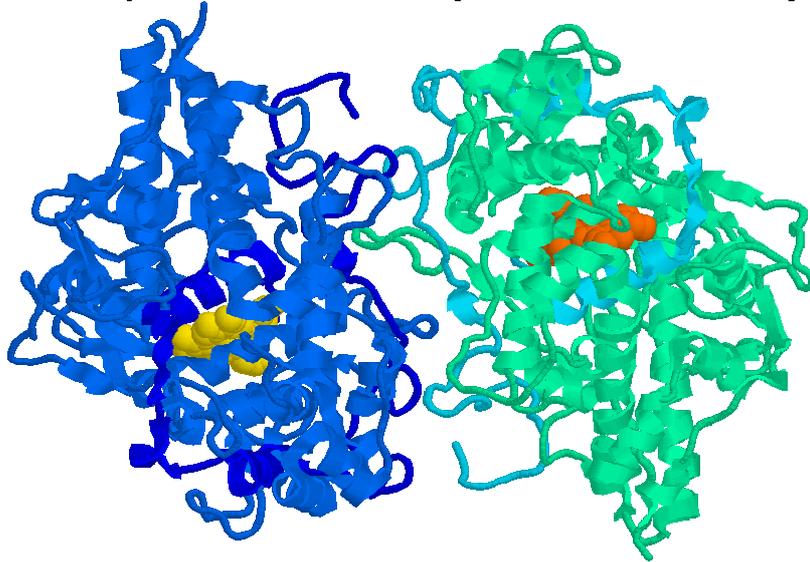
Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing  
By Mark B. Hampton, Anthony J. Kettle, and Christine C. Winterbourn  
BLOOD The Journal of The American Society of Hematology, VOL 92, 1998

gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 24 -

## Mieloperossidasi (EC 1.11.1.7)



gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 25 -

## 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	$\text{ONOO}^-$	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 © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

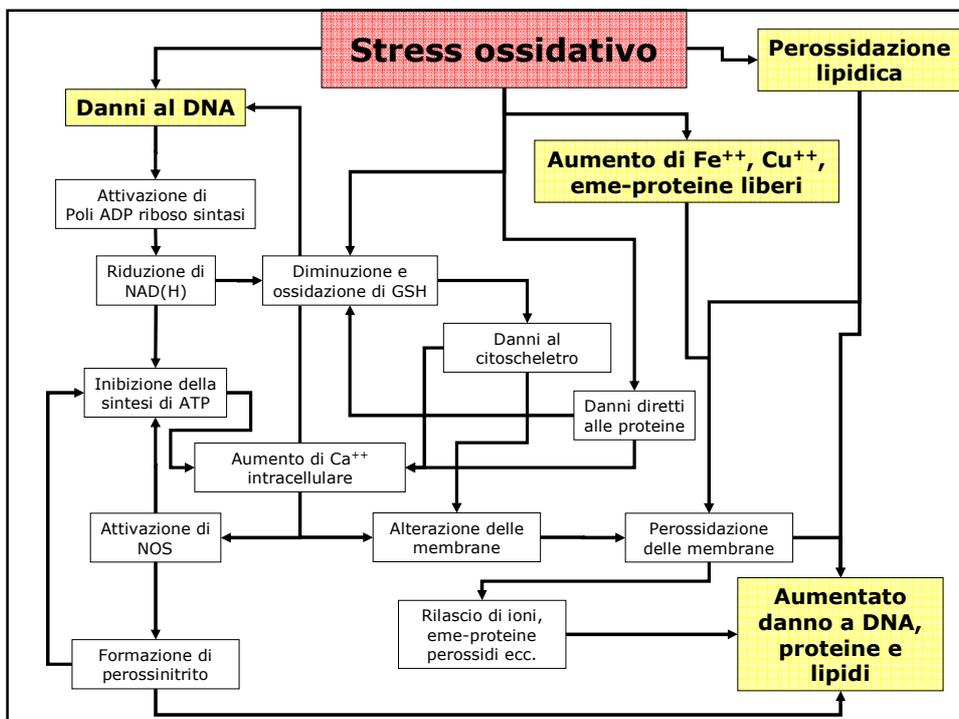
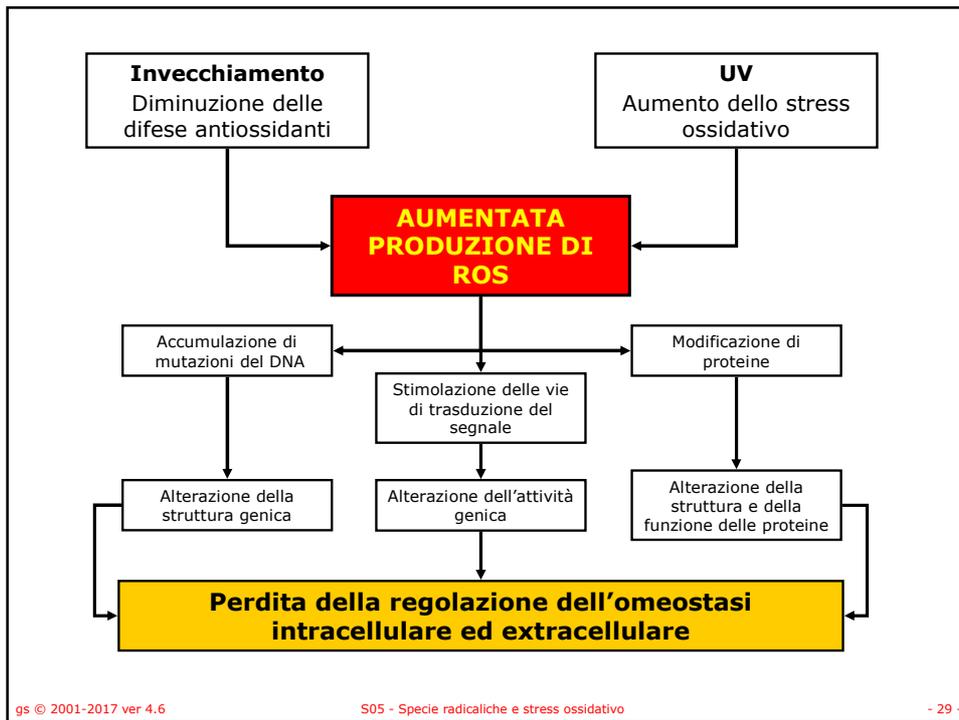
- 26 -

## 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

## 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**



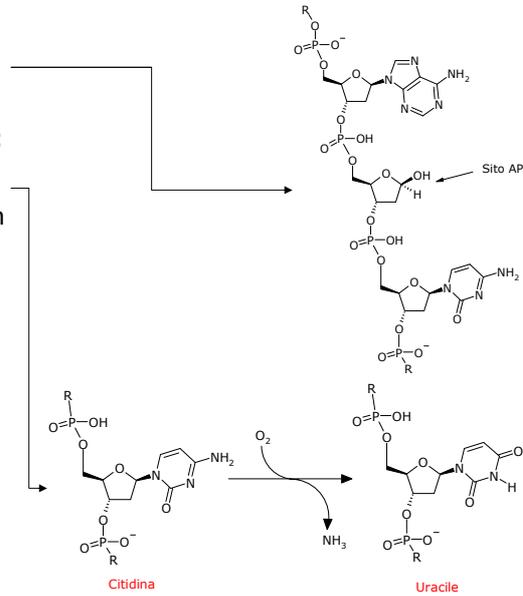
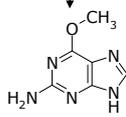
## Danni al DNA

- Danni endogeni
  - ROS prodotti dal metabolismo, portano alla deaminazione ossidativa
- Danni esogeni da:
  - Radiazioni: UV (200-400 nm), Raggi X, Raggi  $\gamma$
  - 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



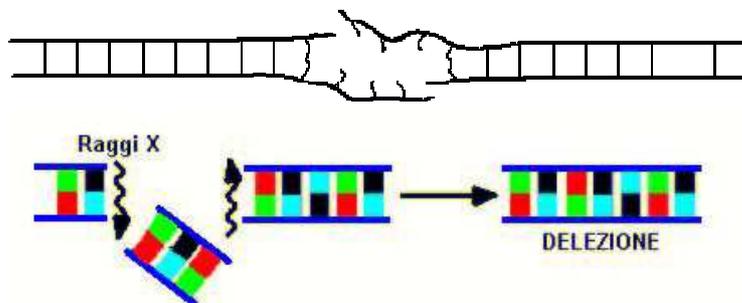
gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 33 -

## Danni Fisici: Radiazioni Ionizzanti

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



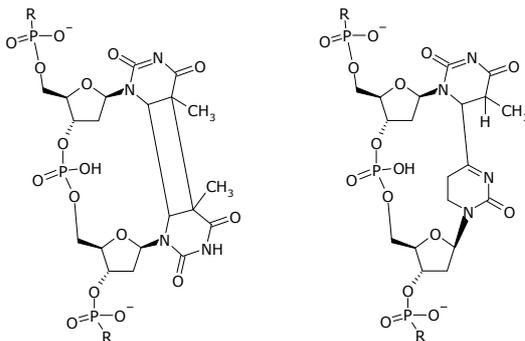
gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 34 -

## Danni Fisici: Radiazioni UV

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



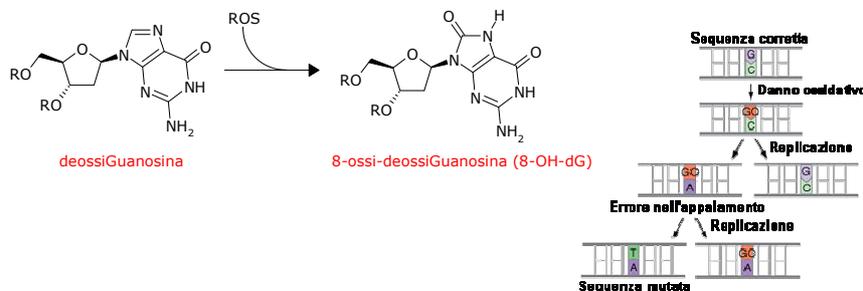
gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 35 -

## Danni chimici: ROS

- Causano ossidazione delle basi e **amplificano** deamminazioni e depurinazioni.
- Un esempio di composto ossidato è 8-OH-dG : causa trasversioni delle basi GC → TA



gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 36 -

# 8-OH-dG

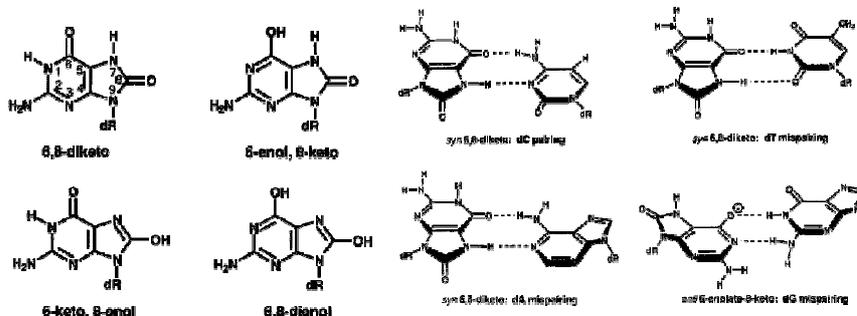


Figure 1. Tautomeric forms of 8-OH-dG.

Figure 6. Base pairing and mispairing resulting from the syn 6,8-diketo and anti 6-enolate-8-keto forms of 8-OH-dG.

Chem. Res. Toxicol. 1989, 2, 416-422

## Structural and Conformational Analyses of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine

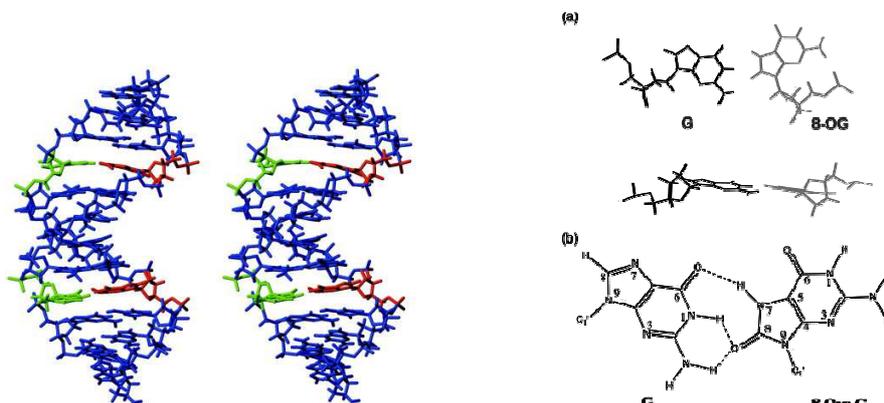
Sandra J. Culp,\* Bongsup P. Cho, Fred F. Kadlubar, and Frederick E. Evans

gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 37 -

# 8-OH-dG



Stereo view of the final averaged structure of the 8-OG:G mismatched 12-mer duplex. The 8-OG residues are shown in green and the base-paired G residues are shown in red.

- (a) Refined structure of the 8-OG:G mismatched duplex, viewed along the helical axis, showing the 8-OG:G base mis-pair.
- (b) A diagram of the 8-OG:G mis-pair showing the three-centered hydrogen bonding between the O8 of the 8-OG residue at the amino and imino protons of the G residue.

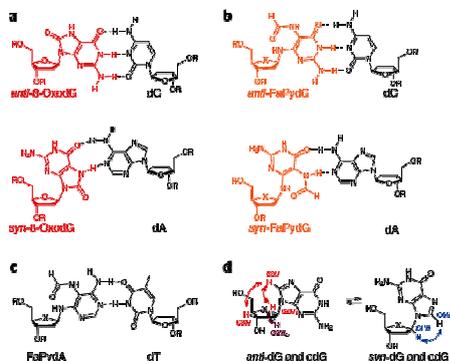
Solution Structure of a DNA Duplex Containing 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Opposite Deoxyguanosine  
V. Thiyyanathan, A. Somasunderam, T.K. Hazra, S. Mitra, D.G. Gorenstein  
Journal of Molecular Biology 325, (2003) 433-442

gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 38 -

# 8-OH-dG



**Figure 1 | Representation of the two main oxidation products of 2'-deoxyguanosine (8-oxodG, FaPydG) and FaPydA.** (a) For 8-oxodG, the crystallographically observed 8-oxodG-dC and 8-oxodG-dA base pairs are shown. (b,c) Additionally, the putative base pairs formed by FaPydG and FaPydA are depicted. In the natural FaPy lesions, X = O, whereas in the stabilized carbocyclic analogs of FaPydG (b) and FaPydA (c), X = CH<sub>2</sub>. (d) Depiction of the through-space interactions between C8H and the sugar protons in the *anti* conformer (red) and the *syn* conformer (blue). The reference NOESY signal between interactions was quantified, giving the same *syn/anti* distribution for both dG and cdG.

ARTICLE  
 10.1038/nchembio.1251

## Unexpected non-Hoogsteen-based mutagenicity mechanism of FaPy-DNA lesions

Tim H. Geierle<sup>1,2</sup>, Ulrike Lischke<sup>1,2</sup>, Karola I. Gatzeliger<sup>1,2</sup>, Sabine Schneider<sup>1,2</sup>, Srinemo Arnold<sup>1</sup>, Helga C.M.Mier<sup>1</sup>, David S. Stephenson<sup>1</sup>, Hendrik Zipse<sup>1</sup> & Thomas Carell<sup>1\*</sup>

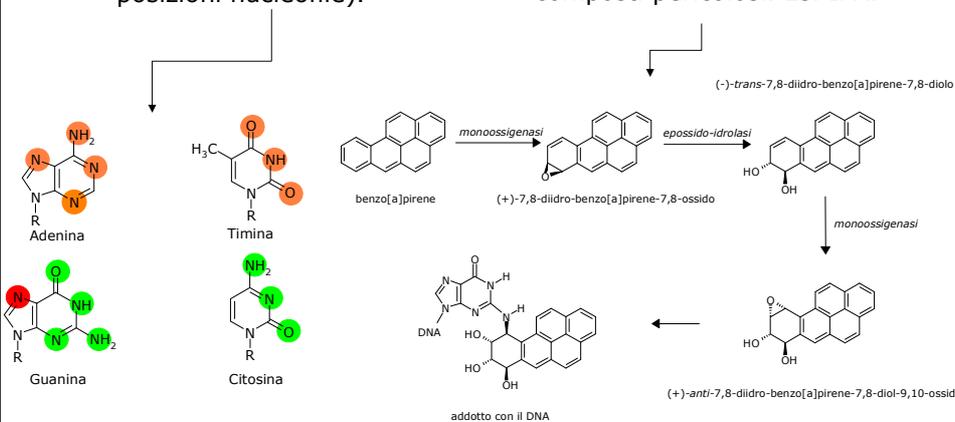
gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 39 -

# 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 © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

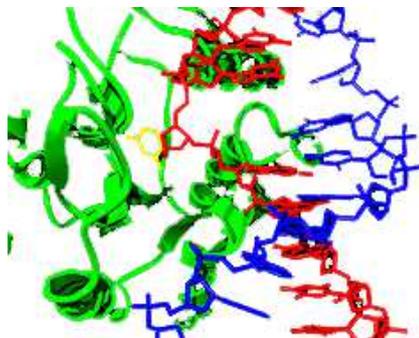
- 40 -

## 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 glicosilasi. La base mancante è risintetizzata da una DNA polimerasi e reinserita da una DNA ligasi
- Nucleotide excision repair (NER), riconosce distorsioni dell'elica come la formazioni 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

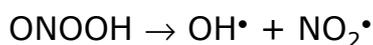


## Riparazione del danno double-strand

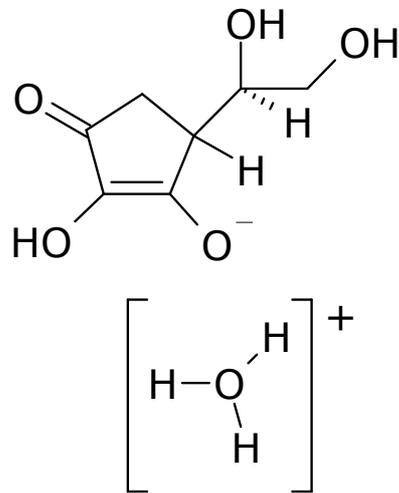
- Non-homologous end joining (NHEJ), microhomology-mediated end joining (MMEJ) e ricombinazione omologa
- L'enzima DNA ligasi ripristina il legame tra nucleotidi con la formazione di un legame estereo tra il fosfato e il nucleotide
- In NHEJ, DNA Ligasi IV, è una DNA ligasi specifica che forma un complesso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



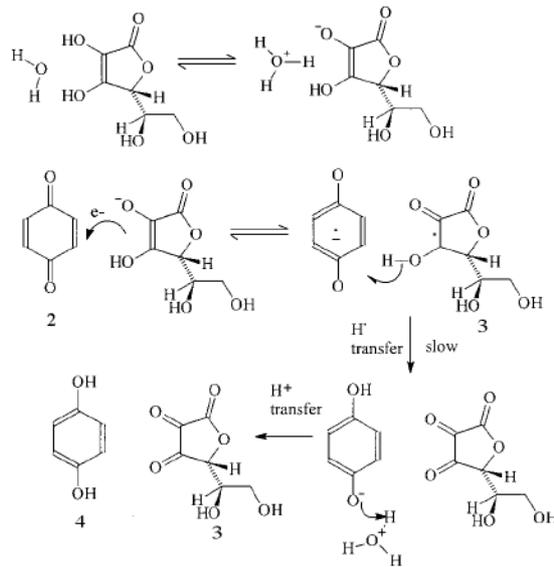
# Acido ascorbico (Vit. C)



gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 45 -



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

1465

gs © 2001-2017 ver 4.6

S05 - Specie radicaliche e stress ossidativo

- 46 -

## 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.gsartor.org/pro/didattica>
- 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](mailto:giorgio.sartor@unibo.it)

Data ultima versione: 27/02/2017 10:18