

Univerzita Karlova v Praze

Prírodovedecká fakulta

Študijný program: Molekulárna biológia a biochémia organizmov

Študijný obor: Špeciálne biologicko-chemické obory



Maroš Kompas

Zmeny redoxného stavu bunky pri vírusových infekciách

Changes of the intracellular redox state during virus infections

Bakalárska práca

Školiteľ: MUDr. Zora Mělková, Ph.D.

Praha, 2019

Vyhlasenie

Vyhlasujem, že som záverečnú prácu spracoval samostatne, a že som uviedol všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca, ani jej podstatná časť, nebola predložená ku získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 2019

Podpis

Chcel by som poďakovať MUDr. Zore Mělkovej, Ph.D. za jej ochotu a čas, ktorú mi v súvislosti s prípravou práce venovala.

Obsah

Zoznam použitých skratiek.....	VI
Abstrakt.....	XII
1. Úvod.....	1
1.1. Reaktívne zlúčeniny kyslíka (ROS).....	2
1.2. Reaktívne zlúčeniny dusíka (RNS).....	5
1.3. Reaktívne zlúčeniny síry (RSS).....	6
1.4. Antioxidačné systémy.....	6
2. Oxidatívny stres.....	8
2.1. Poškodenie lipidov prostredníctvom ROS	8
2.2. Poškodenie proteínov prostredníctvom ROS	9
2.3. Poškodenie DNA prostredníctvom ROS	10
3. Signalizácia pomocou ROS.....	12
3.1. Nrf2/Keap1 signalizačná dráha.....	13
3.2. Transkripčný faktor NF- κ B.....	14
3.3. Interferón regulujúci faktor 3 (IRF3)	16
4. Modulácie redoxnej homeostázy prostredníctvom vírusov.....	17
4.1. Vírusové ochorenia dýchacích ciest.....	18
4.2. Vírus Hepatitídy C (HCV).....	20
4.3. HIV-1 (vírus ľudskej imunodeficiencie 1).....	22
5. Záver	25

Zoznam použitých skratiek

Skratka	Preklad	Originálne znenie v angličtine
8-oxoG	8-oxo-7,8dihydroguanín	8-oxo-7,8dihydroguanine
A	adenín	adenine
AIDS	syndróm nadobudnutej imunodeficiencie	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ARE	antioxidačne responzívny element	antioxidant response element
ATP	adenozín trifosfát	adenosine triphosphate
bZIP	základné leucínové zipsy	basic leucine zippers
CA	proteín kapsidy	capsid
CARD	kaspázu aktivujúca a regrutujúca doména	Caspase activation and recruitment domains
CAT	kataláza	catalase
CCR5	C-C chemokínový receptor typu 5	C-C chemokine receptor type 5
CF	cystická fibróza	cystic fibrosis
CNC	transkripčné faktory typu „Cap ‘n’ Collar“	Cap ‘n’ Collar
COPD	chronická obštrukčná choroba pľúc	chronic obstructive pulmonary disease
COX	cyclooxygenáza	cyclooxygenase
Cul3	proteín Cullin3	Cullin3
CXCR4	C-X-C chemokínový receptor typu 4	C-X-C chemokine receptor type 4
cyklo-dA	5',8-cyklo-2'-deoxyadenozín	5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine
cyklo-dG	5',8-cyklo-2'-deoxyguanozín	5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine
d2Ih	5-karboxamido-5-formamido-2-iminohydantoín	5-carboxamido-5-formamido-2-iminohydantoin
dGh	5-guanidinohydantoín	5-guanidinohydantoin
DNA	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleic acid

dSp	spiroiminodihydantoínu	spiroiminodihydantoin
dsRNA	dvojláknová RNA	double-stranded RNA
Duox	duálna oxidáza	dual oxidase
dZ	2,2,4-triamino-2H-oxazol-5-ón-2'-deoxyribonucleozid	2,2,4-triamino-2H-oxazol-5-one-2'-deoxyribonucleoside
E	proteín vírusového obalu	envelope protein
EGF	epidermálny rastový faktor	epidermal growth factor
EGFR	receptor pre epidermálny rastový faktor	epidermal growth factor receptor
eNOS (NOS3)	endoteliálna NO syntáza	endothelial NO synthase
ERK	kináza regulovaná extracelulárnym signálom	extracellular-signal-regulated kinase
Fapy	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidín	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
G	guanín	guanine
gp	glykoproteín	glycoprotein
GPx	glutatión peroxidáza	glutathion peroxidase
GRx	glutaredoxín	glutaredoxin
GSH	glutatión	glutathion
GSSG	glutatión disulfid	glutathion disulfide
GSTA4	glutatión S-transferáza A4	glutathion S-transferase A4
GTP	guanozín trifosfát	guanosine triphosphate
HCV	vírus hepatitídy C	hepatitis C virus
HIV	vírus ľudskej imunodeficiencie	Human immunodeficiency virus
HMPV	ľudský metapneumo vírus	human metapneumo virus
HO-1	hém oxygenáza	heme oxygenase 1
HRSV	ľudský respiračný synciálny vírus	human respiratory syncytial virus
HRV	ľudský rinovírus	human rhinovirus
ICAM-1	intracelulárna adhezívna molekula 1	Intercellular adhesion molecule 1
IFN	interferón	interferon

IKK	kináza inhibičného proteínu κ B	I κ B kinase
IL	interleukín	interleukin
IN	integráza	integrase
<i>in vivo</i>	v živom organizme	in living organism
iNOS (NOS2)	inducibilná NO syntáza	inducible NO synthase
IRAK1	kináza asociovaná s receptorom pre interleukín 1	IL-1 receptor-associated kinase
IRF3	interferón regulujúci faktor 3	interferon regulatory factor 3
IV	vírus chrípky	influenza virus
IκB	inhibitor jadrového faktoru κ B	inhibitor of nuclear factor κ B
kb	kilobázy	kilobases
Keap1	proteín 1 asociovaný s Kelch-like ECH	Kelch-like ECH associated protein 1
LTR	dlhé terminálne opakujúce sa sekvencie	long terminal repeats
MA	matrix proteín	matrix
MAPK	mitogénom aktivovaná proteínkináza	mitogen-activated protein kinases
MAVS	mitochondriálna antivírusová signalizácia	mitochondrial antiviral signaling
MCP-1	chemoatraktantový proteín monocytov 1	Monocyte chemoattractant protein 1
MDA	malondialdehyd	malondialdehyde
MDA5	proteín 5 asociovaný s diferenciáciou melanómu	melanoma differentiation associated protein 5
MGST	mikrozomálna glutatión S-transferáza	microsomal glutathion S-transferase
NADP⁺	Nikotinamidadeninukleotidfosfát	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	redukovaná forma NADP ⁺	reduced form of NADP ⁺
NC	nukleokapsidový proteín	nucleocapsid
Neh	Nrf2-ECH homológy	Nrf2-ECH homologues

NEMO (IKKγ)	esenciálny modulátor NF- κ B	NF- κ B essential modulator
NF- κB	jadrový faktor κ B	nuclear factor κ B
NLS	jadrový lokalizačný signál	nuclear localization signal
nNOS (NOS1)	neurálna NO syntáza	neuronal NO synthase
Nox	NADPH oxidáza	NADPH oxidase
NQO1	NAD(P)H:chinón oxidoreduktáza 1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1
Nrf2	faktor 2 príbuzný jadrovému erytroidnému faktoru 2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NS	neštruktúrálny proteín	non-structural protein
ORF	otvorený čítací rámec	open reading frame
ozn.	označovaný/á/é	
p	proteín	protein
PDGF	rastový faktor odvodený od krvných doštičiek	platelet-derived growth factor
PDGFR	receptor pre rastový faktor odvodený od krvných doštičiek	platelet-derived growth factor receptor
PDTC	pyrrolidín ditiokarbamát	pyrrolidinedithiocarbamate
Phox	fagocytárna oxidáza	phagocytic oxidase
PKA	proteínkináza A	protein kinase A
PKC	proteínkináza C	protein kinase C
PMNL	polymorfonukleárne leukocyty	polymorphonuclear leukocytes
PR	proteáza	protease
PRR	receptory rozpoznávajúce vzorce patogénov	pattern recognition receptors
PRx	peroxiredoxín	peroxiredoxin
P-TEFb (Cyklin/CDK9)	pozitívny transkripčný elongačný faktor	positive transcription elongation factor
PTPs	proteínové tyrozín fosfatázy	protein tyrosine phosphatases
Rac2	proteín Rac2 príbuzný proteínu Ras	Ras-related protein Rac2

Rap1A	proteín Rap1A príbuzný proteínu Ras	Ras-related protein Rap1A
Rbx1	RING-box proteín 1	RING-box protein
RHD	domény homológne s Rel	Rel homology domains
RIG-I	gén I indukovateľný kyselinou retinovou	retinoid acid inducible gene
RLR	receptory podobné RIG-I	RIG-I- like receptors
RNA	ribunukleová kyselina	ribonucleic acid
RNS	reaktívne zlúčeniny síry	reactive sulphur species
RONS	reaktívne zlúčeniny kyslíka a dusíka	reactive oxygen and nitrogen species
ROS	reaktívne zlúčeniny kyslíka	reactive oxygen species
RS	reaktívne zlúčeniny	reactive species
RSS	reaktívne zlúčeniny dusíka	reactive nitrogen species
RT	reverzná transkriptáza	reverse transcriptase
RTKs	receptorové tyrozín kinázy	receptor tyrosine kinases
RV	respiračné vírusy	respiratory viruses
Sev	Sendai vírus	Sendai virus
SH2	Src homológy 2	Src Homology 2
SOD	superoxid dismutáza	superoxid dismutase
SRx	sulfredoxín	sulfredoxin
TAB	kináza aktivovaná prostredníctvom TGF β a MAP3K7 väzobný proteín	TGF β -activated kinase and MAP3K7-binding protein
TAK1 (MAP3K7)	mitogénom aktivovaná proteínová kináza 7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
TAR	element rezponzívny na <i>trans</i> aktiváciu	trans-acting response element
<i>tat</i>	transaktivátor transkripcie	transactivator of transcription
TBK1	proteín viažuci TANK	TANK-binding protein 1
TLRs	Toll-like receptory	Toll-like receptors
TM	transmembránový proteín	transmembrane

TNF	tumor nekrotizujúci faktor	tumor necrosis factor
TRAF6	faktor 6 asociovaný s receptorom pre tumor nekrotizujúci faktor	TNF receptor associated factor 6
TRx	tioredoxín	thioredoxin
VCAM-1	adhéznny proteín vaskulárnych buniek 1	Vascular cell adhesion protein 1
XO	xantín oxidáza	xanthine oxidase

Abstrakt

Vírusy predstavujú infekčné agens, v súvislosti s ktorými dochádza k narušeniu redoxnej homeostázy hostiteľských buniek. Tento efekt je daný odpoveďou hostiteľskej bunky na infekciu a prostredníctvom génových produktov vírusu. Za tohto predpokladu nastáva v bunkách oxidatívny stres, ktorý je spojený s poškodzovaním bunkových komponentov. Pri narušení redoxnej homeostázy dochádza k aktivácii bunkovej adaptívnej odpovede na oxidatívny stres pomocou transkripčného faktora Nrf2, výsledkom čoho je posilnená expresia antioxidantných enzýmov, ktorých úlohou je navrátiť redoxné prostredie bunky na fyziologické hodnoty. Za suboptimálnych redoxných podmienok, alebo za predpokladu, že v bunke bola detegovaná prítomnosť cudzorodej nukleovej kyseliny, rovnako dochádza k aktivácii redoxne senzitívneho transkripčného faktora NF- κ B. To vedie k aktivácii expresie mediátorov imunitných odpovedí, ktoré majú pri dlhodobých zápaloch nepriaznivé účinky na okolité tkanivá. Túto skutočnosť využívajú vírusy, ktoré si v procese evolúcie vyvinuli prostriedky, vďaka ktorým dokážu zneužiť či zablokovať dráhy regulujúce redoxnú homeostázu a odpoveď bunky na infekciu, výsledkom čoho dochádza k propagácii infekcie.

Kľúčové slová: redoxný stav bunky, ROS, RNS, oxidatívny stres, antioxidantní enzýmy, regulácia génovej expresie, vírusové infekcie

Abstract

Viruses are infectious agents, which can cause dysregulation of the host cellular redox homeostasis. This effect on redox environment of the cell is mediated by cellular defense machinery and via viral gene products. In order to restore normal cellular redox environment during oxidative stress, which is associated with deleterious effects on cellular components, activation of adaptive response takes place. The response is based namely on activation of transcription factor Nrf2, which leads to upregulation of gene expression of antioxidant enzymes. Under suboptimal redox conditions, or upon detecting foreign nucleic acid, redox sensitive transcription factor NF- κ B is also activated. This leads to expression of proteins mediating cellular immune responses, which might exhibit damaging effects on the surrounding tissues during chronic inflammations. With respect to that, viruses have evolved mechanisms, through which they are able to overcome or hijack pathways regulating cell redox homeostasis and responses to infectious agents, resulting in amplification of the infection.

Key words: intracellular redox state, ROS, RNS, oxidative stress, antioxidant enzymes, regulation of gene expression, virus infections

1. Úvod

Redoxný stav a oxidatívny stres sa stali vo vedeckej literatúre často skloňovanými termínmi, pretože figurujú v širokom spektre bunkových procesov, vrátane kontroly bunkového cyklu, bunkovej signalizácie, transkripcie a imunomodulácie. Termín redoxný stav bol pôvodne používaný na opis pomeru medzi oxidovanou a redukovanou formou konkrétneho redoxného páru (napr. $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$), v ktorom jedna z týchto zlúčenín vystupuje pri redoxnej reakcii ako donor elektrónov (NADPH) a druhá ako ich akceptor (NADP^+). V dnešnej vedeckej literatúre sa však tento termín využíva na všeobecnejší, kvalitatívny opis redoxného prostredia bunky, ktoré je dané súhrnom oxidačno-redukčných vlastností všetkých redoxných párov vyskytujúcich sa v danom systéme. Vzhľadom na to, že najhojnejším redoxným párom v bunke je GSH/GSSG (redukovaný glutatión/glutatión disulfid), považuje sa pomer koncentrácií týchto dvoch látok za relevantný indikátor redoxného stavu bunky (Schafer* et al., 2001). Za predpokladu, že je narušená redoxná rovnováha v bunkách, hovoríme o oxidatívnom strese. Ten môže byť vyvolaný exogénnymi či endogénnymi faktormi, pričom na molekulárnej úrovni dochádza k poškodzovaniu biologických makromolekúl najmä reaktívnymi zlúčeninami kyslíka či dusíka (ďalej RONS) (Phaniendra* et al., 2015). V súvislosti s tým v bunkách taktiež dochádza k tvorbe reaktívnych zlúčenín síry (Giles* et al., 2002)

U aeróbnych organizmov dochádza ku tvorbe malého množstva ROS (reaktívne zlúčeniny kyslíka) i za optimálnych podmienok počas prechodu elektrónov cez komplexy dýchacieho reťazca, a teda ich produkcia je spriahnutá s bazálnym metabolizmom. Prvotne sa predpokladalo, že prítomnosť RONS v bunkách je čisto nežiadúca, no v posledných dvoch dekádach sa ukázalo, že RONS slúžia v nízkej koncentrácii ako signálne molekuly regulujúce fyziologické procesy. V súvislosti s tým, aby bola zachovaná signalizačná funkcia RONS a zároveň nedochádzalo k poškodzovaniu biomakromolekúl, je v bunkách prítomné množstvo antioxidantných látok a enzýmov, ktoré tieto potencionálne škodlivé zlúčeniny odbúravajú (Meo* et al., 2016).

Primárne dochádza k zvýšenej produkcii RONS výsledkom činnosti vrodenej imunity, kedy makrofágy a neutrofilý priamo i nepriamo prispievajú k produkcii RONS v mieste infekcie. Spočiatku zvýšený výskyt RONS pomáha v boji proti infekcii, a teda slúži ako obranný mechanizmus (Vazquez-Torres et al., 2000). Ako sa však vírus replikuje, dochádza deregulácii bunkovej redoxnej homeostázy. Mimo iné, vírusy si v priebehu evolúcie vyvinuli mechanizmy, vďaka ktorým dokážu inaktivovať antioxidantné enzýmy či obmedziť ich exprimáciu, čo využívajú pre svoju propagáciu (Garaci et al., 1997).

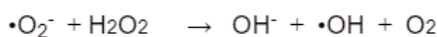
Cieľom tejto práce bude opísať k akým zmenám dochádza v súvislosti s oxidatívnym poškodením a signalizáciou v bunkách v prítomnosti ROS, poukázať na dôležitosť antioxidantných systémov a rozobrať akými prostriedkami niektoré vírusové ochorenia rozvracajú túto vyladenú mašineriu.

1.1 Reaktívne zlúčeniny kyslíka (ROS)

ROS je možné charakterizovať ako chemické zlúčeniny obsahujúce kyslík, ktoré sú reaktívne voči lipidom, proteínom a DNA (deoxyribonukleová kyselina). Radia sa k nim zlúčeniny ako je ozón (O_3), superoxidový anión ($O_2^{\bullet-}$), singletový kyslík (1O_2), peroxid vodíka (H_2O_2) a hydroxidový radikál ($\bullet OH$). K endogénnym zdrojom ROS patria napríklad mitochondrie, peroxizómy, endoplazmatické retikulum a fagocytárne bunky. Produkcia ROS prostredníctvom týchto organel je spojená s mnohými fyziologickými funkciami bunky, a teda k nej dochádza v rámci normálneho metabolizmu. K exogénnym zdrojom ROS patrí najmä znečistený vzduch, tabakový dym, alkohol, tranzitné a ťažké kovy, pesticídy a niektoré lieky (Phaniendra* et al., 2015).

$O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 a $\bullet OH$ vznikajú u aeróbných organizmov v súvislosti s prechodom elektrónov cez dýchací reťazec, kedy výsledkom činnosti komplexov I a III dochádza ku vzniku superoxidového aniónu (Cadenas et al., 1977; Turrens et al., 1980). $O_2^{\bullet-}$ vzniká redukciou molekulárneho kyslíku jedným elektrónom, k čomu môže dochádzať spontánne či prostredníctvom enzymatickej aktivity. V roku 1978 bolo navrhnuté, že ako vzniká $O_2^{\bullet-}$, dochádza k Haber-Weissovej reakcii, kedy $O_2^{\bullet-}$ redukuje Fe^{3+} na Fe^{2+} , ktorý môže ďalej vystupovať vo Fentonovej reakcii, pričom vzniká $\bullet OH$ (McCord et al., 1978). Neskôr bolo ukázané, že efekt $O_2^{\bullet-}$ na tvorbu $\bullet OH$ nie je priamy, ale že jeho úloha spočíva v uvoľňovaní železa z 4Fe-4S komplexov, v dôsledku čoho narastá intracelulárna koncentrácia voľného železa, s čím je spojené oxidatívne poškodzovanie molekúl DNA (Keyer et al., 1996). Keyer a kolektív ďalej demonštrovali, že k redukcii voľného železa v bunke dochádza aj v neprítomnosti $O_2^{\bullet-}$, pričom navrhli, že túto reakciu v bunke môže sprostredkovať iný reduktant. Za tohto predpokladu môže dochádzať k Fentonovej reakcii, ktorá predstavuje druhý krok v Haber-Weissovej reakcii (viď schéma 1), bez toho aby sa na nej priamo podieľal superoxidový anión (Keyer et al., 1996). So zreteľom na tieto výsledky je možné konštatovať, že k tvorbe $\bullet OH$ *in vivo* nedochádza v dôsledku Haber-Weissovej reakcie, nakoľko železo nie je redukované priamo $O_2^{\bullet-}$, ale prostredníctvom iného zdroja elektrónov.

Haber-Weissová reakcia



1. krok



2. krok (Fentonová reakcia)

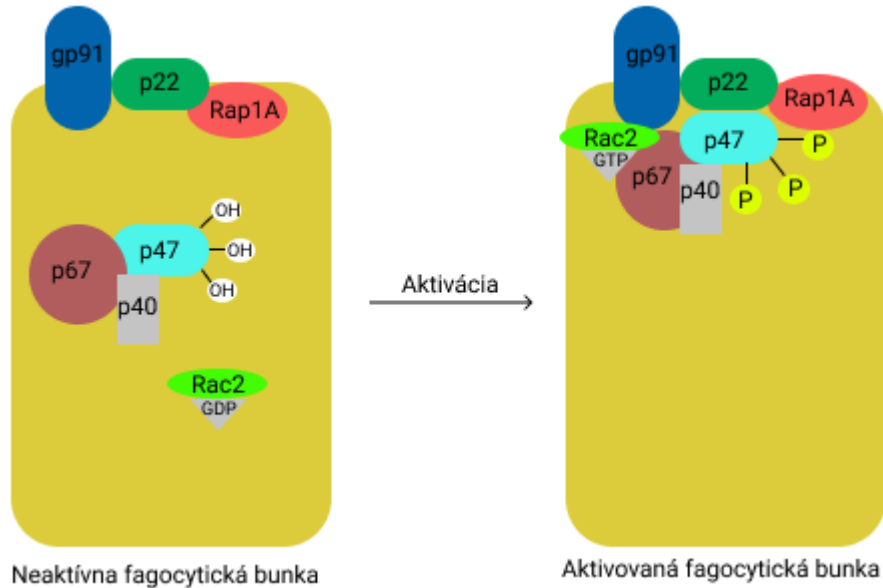
Schéma 1- chemický zápis Haber-Weissovej a Fentonovej reakcie. Haber-Weissova reakcia pozostáva z dvoch polreakcií, pričom v prvom kroku dochádza k redukcii trojmocného železa (Fe^{3+}) pomocou $O_2^{\bullet-}$ na Fe^{2+} . Dvojmocné železo môže spolu s H_2O_2 ďalej reagovať vo Fentonovej reakcii, pri ktorej vzniká reaktívny hydroxylový radikál.

Ku vzniku H_2O_2 a $O_2^{\bullet-}$ môže dochádzať tiež prostredníctvom enzýmov, a to napríklad pomocou nikotín adenín dinukleotid fosfát (NADPH) oxidáz (Nox) a duálnych oxidáz (Duox), ktoré spolu tvoria rodinu enzýmov Nox/Duox, ktorá má 7 členov. Predstavujú ich enzýmy Nox1-5 a Duox1-2 (Meo* et al., 2016). K ďalším enzýmom produkujúcim ROS patria napríklad xantín oxidáza (XO)(Nishikimi,

1975), cytochróm P450 monooxygenázový systém (Hartmut et al., 1982), aldehyd oxidáza (Kundu et al., 2012), cyklooxygenázy (COX), lipooxygenázy (Swindle et al., 2007), monoamín oxidáza (Pizzinat et al., 1999) alebo myeloperoxidáza (Harrison et al., 1976). Na rozdiel od ROS, ktoré vznikli v dôsledku úniku elektrónov z komplexov dýchacieho reťazca, je enzymatická produkcia týchto ROS cielená. Vzhľadom na povolený rozsah práce budú však podrobnejšie rozobrané len enzýmy z Nox/Duox rodiny, nakoľko dochádza k moduláciám ich aktivity počas vírusových infekcií.

NADPH oxidázy sú transmembránové proteíny transportujúce elektrón cez biologické membrány, ktoré slúžia k redukcii kyslíka na $O_2^{\bullet-}$ (Koshkin et al., 1997). Pôvodne bol známy len jeden enzým z rodiny Nox označovaný ako *Phox* (phagocytic oxidase) či Nox2, ktorý je lokalizovaný na membráne fagocytárnych buniek, najmä u makrofágov a neutrofilov. Nox2 hrá totiž dôležitú úlohu v procese nazvanom *oxidatívne vzplanutie*, kedy dochádza k ničeniu patogénov spôsobom závislým na tvorbe $O_2^{\bullet-}$ vo fagozóme (DeLeo et al., 1999). Ďalšími enzýmami z tejto rodiny sú napríklad Nox1, lokalizovaná na apikálnej strane buniek črevného epitelu (Geiszt et al., 2003a), či Nox4, ktorá je najviac exprimovaná v tubulárnom systéme obličiek (Geiszt et al., 2000; Shiose et al., 2001). Jednotlivé izoenzýmy vykazujú relatívne vysokú úroveň homológie, a to najmä Nox1-Nox3. Nox4 vykazuje iba 39% homológiu s Nox2 (Bedard* et al., 2007). Pre účel tejto práce bude však ako modelový izoenzým opísaná Nox2 pre jej dôležitosť v imunitných reakciách.

Katalytická aktivita Nox2 je prísne regulovaná prostredníctvom fosforylácie cytozolickéj podjednotky p47^{Phox}, ktorá je po aktivácii makrofágov potranslačne modifikovaná (DeLeo et al., 1999) a spolu s ďalšími cytozolickými podjednotkami Nox2, p67^{Phox} (Clark et al., 1990) a p40^{phox}, ako komplex translokovaná ku katalytickému miestu (Wientjes et al., 1993), ktorým je cytochróm b₅₅₈ (Isogai et al., 1991), heterodimér s podjednotkami p22^{phox} a gp91^{Phox} (Yu et al., 1998). Mimo vyššie uvedených súčastí Nox2 sú pre jej aktiváciu nutné ešte dve nízkomolekulové zlúčeniny Rac2 (proteín Rac2 príbuzný proteínu Ras) (Knaus et al., 1992) a Rap1A (proteín Rap1A príbuzný proteínu Ras) (Quinn et al., 1992). Rac2 pri aktivácii imunitnej reakcie viaže guanozín trifosfát (GTP), Mg²⁺-dependentným spôsobom, a translokuje na membránu spolu s cytoplazmatickými podjednotkami Nox2 (Knaus et al., 1992). Rap1A je v neaktivovaných neutrofiloch lokalizovaný na membráne s cytochrómom b₅₅₈, alebo je po aktivácii neutrofilov na membránu dopravený v rámci sekretorickej vezikuly, ktorá s cieľovou membránou sfúzuje (Quinn et al., 1992). Na aktiváciu Nox2 je teda potrebných hneď niekoľko proteínov, ktoré sú nevyhnutné pre vykonávanie jej katalytickej funkcie. Celý tento proces je iniciovaný v prípade styku buniek s nežiadúcimi mikroorganizmami alebo v prítomnosti mediátorov imunitnej odpovede (Lambeth*, 2004). Takto zložitý systém bol pravdepodobne vyvinutý z dôvodu potencionalnej hrozby vyplývajúcej z nadprodukcie ROS. Za predpokladu, že by Nox2 bola neustále aktívna, dochádzalo by k extenzívnej produkcii $O_2^{\bullet-}$, čo by malo za následok rozvrátenie redoxnej homeostázy.



Obrázok 1- Grafické znázornenie neaktívneho/aktívneho Nox2 komplexu. Pri aktivácii neutrofilov či makrofágov dochádza fosforyláciou špecifických serínových aminokyselín v štruktúre proteínu p47Phox, výsledkom čoho dochádza k translokácii komplexu p47Phox-p67Phox- p40Phox na membránu ku katalytickému miestu Nox2. V neaktivovaných makrofágoch nedochádza k fosforylácii p47Phox a cytozolické podjednotky p47Phox- p67Phox- p40Phox nie sú translokované na membránu, čím nedochádza k aktivácii činnosti Nox2. Prevzaté a upravené podľa (Lambeth*, 2004)

Ďalším typom enzýmov podstatných v procese regulovanej tvorby ROS sú duálne oxidázy. Dnes sú známe dva izoenzýmy duálnych oxidáz, a to menovite Duox1 a Duox2, ktoré sa radia do enzymatickej rodiny Nox/Duox. Duálne oxidázy boli prvotne charakterizované ako výhradne H₂O₂ produkujúce enzýmy, ktoré sú exprimované na membránach tyroidných buniek (Dupuy et al., 1999; Dupuy et al., 1989). Neskôr bolo zistené, že na funkcii Duox2 závisí produkcia tyroidného hormónu (Moreno et al., 2002). Mimo toho bola ich prítomnosť potvrdená aj na apikálnych stranách epitelových buniek dýchacieho a gastrointestinálneho traktu, pričom bolo navrhnuté, že ich funkcia tu súvisí s antimikrobiálnou obranou (Geiszt et al., 2003b). Rovnako ako u Nox, je katalytická aktivita duálnych oxidáz závislá na fosforylácii špecifických aminokyselín. Tieto potranstlačné modifikácie sú v prípade Duox1 sprostredkované činnosťou PKA (proteinkináza A), kedy dochádza k fosforylácii Ser⁹⁵⁵, ktorá aktivuje jej činnosť. Duox2 je fosforylovaná a aktivovaná činnosťou PKC (proteinkináza C) (Rigutto et al., 2009).

Ku tvorbe ROS môže dochádzať aj v súvislosti s programovanou bunkovou smrťou (apoptóza) (Tan et al., 1998). Tá môže prebiehať buď na základe stimulácie „receptora smrti“ (ozn. aj vonkajšia cesta) alebo mitochondriálnou cestou (ozn. aj vnútorná cesta), ktorá je regulovaná na základe podnetov, ktoré bunka dostáva z okolia. Tieto podnety sú medzi bunkami prenášané prostredníctvom signalizačných molekúl, ktoré môžu regulovať aktiváciu apoptotických dráh buď pozitívne, alebo negatívne. V prípade vnútornej cesty, môže bunka za určitých podmienok prestať prijímať z prostredia náležité signály, výsledkom čoho dôjde k zahájeniu programovanej bunkovej smrti. V princípe dochádza k tomu, že v neprítomnosti určitých rastových faktorov, cytokínov a

hormónov sú pozastavené vnútrobunkové signálne dráhy, výsledkom ktorých sú v bunke produkované antiapoptotické signálne molekuly, ktoré túto apoptotickú dráhu blokujú. Vnútrná cesta apoptózy môže byť taktiež zahájená v súvislosti s nepriaznivými podmienkami, akými sú napríklad radiácia, hypoxia, hypertermia, vírusové infekcie či vysoká koncentrácia voľných radikálov, alebo iných toxínov (Elmore*, 2007). V tomto prípade, rovnako ako v prípade tvorby ROS prostredníctvom komplexov dýchacieho reťazca, teda opäť dochádza k produkcii ROS prostredníctvom mitochondrie.

1.2 *Reaktívne zlúčeniny dusíka (RNS)*

Počas aktivácie makrofágov dochádza, podobne ako v prípade ROS, ku vzniku reaktívnych zlúčenín dusíka (RNS) (Vazquez-Torres et al., 2000). Dochádza k tomu primárne prostredníctvom katalytickej funkcie iNOS (inducibilná NO syntáza, NOS2), výsledkom ktorej vzniká oxid dusnatý (Hevel et al. 1991). Enzým NOS u cicavcov navyše existuje v ďalších dvoch izoformách, menovite nNOS (neurálna NO syntáza, NOS1) a eNOS (endoteliálna NO syntáza, NOS3). NOS1 je výrazne exprimovaná v nervových bunkách (Chen et al., 1997) a NOS3 v bunkách endotelu a v epitelových bunkách (Shaul et al., 1994). Ostatné RNS sú odvodené od reakcie, ktorá nastáva pri kolízii $O_2^{\bullet-}$ s molekulou NO^{\bullet} , pričom vzniká peroxynitritový anión ($ONOO^-$). Ten môže následne reagovať s ďalšími molekulami, za vzniku NO_2 či N_2O_3 (Ma*, 2013). Bolo navyše preukázané, že produkcia $ONOO^-$ v danom systéme môže viesť ku vyčerpaniu jeho antioxidačnej kapacity a navodiť tak oxidatívny stres (Van Der Vliet et al., 1994). Mimo týchto nepriaznivých účinkov RNS, je NO^{\bullet} dôležitým druhým poslom aktivujúcim guanylát cyklázu a proteinkinázy v rôznych fyziologických procesoch. K RNS sa ďalej radia nitrit (NO_2^-), nitroxylový anión (NO^-), peroxynitrát (O_2NOO^-) a nitrosoperoxykarbonát ($ONOOCO_2$) (Phaniendra* et al., 2015).

<i>Oxidant</i>	<i>Rýchlostná konštanta $L mol^{-1} s^{-1}$</i>
Hydroxylový radikál ($\bullet OH$)	7×10^9
Kyselina chlórna ($HOCl$)	4×10^7
Singletový molekulárny kyslík (O_2^-)	2×10^7
Ozón (O_3)	5×10^6
Kyselina peroxynitritová ($ONOOH$)	2×10^3
Superoxidový anión $O_2^{\bullet-}$	$< 0,3$
Peroxyl ($HOO\bullet$)	$< 5 \times 10^1$
Peroxynitrit ($ONOO^-$)	2×10^{-1}
Peroxid vodíka (H_2O_2)	2×10^{-2}

Tabuľka 1- Rýchlostné konštanty druhého rádu pri reakcii rôznych oxidantov s metionínom (v neutrálnom pH vo vode). Prevzaté a upravené podľa (Sies* et al., 2017)

1.3 *Reaktívne zlúčeniny síry (RSS)*

Radia sa medzi ne radikálové zlúčeniny síry ako tiolový radikál (RS^{\bullet}) a neradikálové RSS ako sulfenát (RSO^{-}), sulfinát (RSO_2^{-}), sulfonát (RSO_3^{-}) a sírovodík (H_2S). Tieto zlúčeniny vznikajú prostredníctvom reakcie s ROS, ktoré oxidujú sulfhydrylovú skupinu ($-SH$) cysteínov v rámci štruktúry proteínu, čo môže viesť k jeho inaktivácii (Giles* et al., 2002). Bolo navyše zistené, že tiolové radikály môžu v prítomnosti kyslíku ďalej reagovať, za vzniku ďalších radikálových zlúčenín síry, vrátane tioperoxylového radikálu ($RSOO^{\bullet}$) či sulfinylového radikálu (RSO^{\bullet}). RSO^{\bullet} je pritom schopný atakovať atóm vodíka z funkčných a postranných skupín proteínu, v dôsledku čoho v tomto mieste vzniká radikál, ktorý môže spúšťať reťazovú reakciu vedúcu k narušeniu jeho štruktúry či funkcie (Yim et al., 1994). Z toho jasne vyplýva, že v súvislosti s oxidatívnym stresom dochádza aj ku vzniku RSS, ktoré môže ďalej propagovať jeho negatívny vplyv na biologické makromolekuly.

1.4 *Antioxidačné systémy*

Aby sa zabránilo akumulácii $O_2^{\bullet-}$ a vzniku ďalších RS (reaktívne zlúčeniny), bola u aeróbných organizmov vyvinutá mašinéria antioxidačných enzýmov, ktoré túto zlúčeninu systematicky rozkladajú na neškodný produkt, ktorým je voda. Medzi tieto enzýmy patria napríklad superoxid dismutáza (SOD), glutatión peroxidáza (GPx), kataláza (CAT), tioredoxín (TRx), peroxiredoxin (PRx), glutaredoxín (GRx), sulfiredoxín (SRx) a v neposlednom rade i neenzymatické antioxidanty, ktorými sú napríklad askorbát, tokoferol či glutatión (He* et al., 2017).

Superoxid dismutázy predstavujú životne dôležité antioxidačné enzýmy, nakoľko premieňajú relatívne reaktívny superoxidový anión na H_2O_2 (Longo et al., 1996). V bunkách cicavcov sa nachádzajú tri izoenzýmy superoxid dismutáz, menovite SOD1, SOD2 a SOD3, líšiac sa svojou lokalizáciou a kofaktormi, ktorý ku svojej funkcii vyžadujú. SOD1 je lokalizovaná najmä v cytozole a jadre, pričom jej kofaktormi sú Cu a Zn (Crapo et al., 1992). Mimo cytozolu je malá časť SOD1 translokovaná do medzimembránového priestoru mitochondrie (Kawamata et al., 2008). SOD2 sa nachádza v mitochondriálnom matrixe a jej kofaktorom je Mn (Fouad, 2015). SOD3 má rovnaké kofaktory ako SOD1, tzn. Cu a Zn. Narozdiel od nej, však SOD3 vykonáva svoju funkciu v extracelulárnom priestore bunky (Marklund et al., 1982) Za optimálnych podmienok tak superoxid dismutázy efektívne transformujú intracelulárny i extracelulárny $O_2^{\bullet-}$ na H_2O_2 .

H_2O_2 môže ako malá nepolárna molekula voľne difundovať cez fosfolipidové membrány bunkových kompartmentov či cytoplazmatickú membránu. Rovnako ako v prípade $O_2^{\bullet-}$ je nutné premeniť peroxid vodíka na neškodný produkt, aby nedošlo ku oxidatívnemu poškodeniu biomakromolekúl. V cytoplazme preto dochádza k redukcii H_2O_2 na vodu pomocou antioxidačných enzýmov ako sú PRx, GPx či CAT. Cicavčie bunky exprimujú 6 PRx izoenzýmov (Leyen et al., 2003). Princíp katalytickej funkcie peroxiredoxínov spočíva v tom, že v jeho aktívnom mieste sa vyskytuje

redoxne aktívny cysteín, ktorý je prostredníctvom peroxidov či ONOO⁻ oxidovaný, pričom sa tieto látky redukujú. V aktívnom mieste PRx po oxidácii ostáva kyselina sulfénová (R-SOH)(Peshenko et al., 2001) či kyselina sulfinová (R-SO₂H)(Woo et al., 2003), ktorá je následne redukovaná späť na tiolovú skupinu cysteínu prostredníctvom tioredoxínu (Chae et al. 1999), glutaredoxínu, sulfiredoxínu (Woo et al., 2004) či askorbátu (Monteiro et al., 2007), v závislosti od typu peroxiredoxínu. Tioredoxín je redukovaný do východiskového stavu v rámci tioredoxínového systému, kedy tioredoxín reduktáza sprostredkúva redukcii disulfidickej formy tioredoxínu pomocou NADPH (Holmgren, 1977). Glutaredoxín a sulfiredoxín najprv tvoria komplex s náležitým peroxiredoxínom, ktorý sa rozpadáva po redukcii glutatiónom, čím je obnovená funkcia daného peroxiredoxínu (Boukhenouna et al., 2015; Peskin et al., 2015).

Enzýmov z rodiny GPx je v cicavčom organizme 8. Rovnako ako peroxiredoxíny sa zúčastňujú na odbúravaní peroxidov, pričom v redoxnej reakcii vzniká opäť voda a oxidovaná forma GPx, ktorá je ďalej redukovaná pomocou GSH (Sena* et al., 2012). Rovnakú úlohu zastáva kataláza v peroxizómoch (Koepke et al., 2007).

GSH je tripeptid so systematickým názvom γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycín, ktorý hrá esenciálnu úlohu v antioxidantných procesoch. Syntéza glutatiónu v bunke je sprostredkovaná pomocou dvoch enzýmov, menovite γ -glutamyl-cysteín ligázy (GCL)(Botta et al., 2008) a GSH syntetázy (GSS)(Nishimura et al., 1964), a to v slede dvoch reakcií. Prvá reakcia predstavuje rýchlosť obmedzujúci krok syntézy GSH, nakoľko tá je priamo závislá na funkcii GCL (Botta et al., 2008). Vzniká v nej γ -glutamyl-cysteín z glutamátu a cysteínu (Janowiak et al., 2005), pričom tento produkt predstavuje substrát pre GSS. GSS najprv tvorí prechodný komplex γ -glutamyl-cysteín-P-GSS z γ -glutamyl-cysteínu a adenzín trifosfátu (ATP). Acyl-fosfát je v tomto komplexe potom atakovaný glycínom, výsledkom čoho vzniká GSH (Nishimura et al., 1964). V rámci antioxidantných procesov dochádza k oxidácii tiolovej skupiny GSH, výsledkom čoho vzniká GSSG, ktorý predstavuje oxidovanú formu tejto redoxne aktívnej látky. V súvislosti s tým, aby bola zachovaná antioxidantná funkcia glutatiónu, musí dôjsť k recyklácii GSH z GSSG. Tá je sprostredkovaná pomocou GSH reduktázy (Hoffmann et al., 2017).

2. Oxidatívny stres

Termín oxidatívny stres bol pôvodne definovaný Helmutom Siesom v roku 1985 ako: „narušenie rovnováhy v prooxidačno – antioxidačnom balanse v prospech toho prvého“ (Sies, 1985). Táto definícia by bola postačujúca za predpokladu, že mechanizmus oxidatívneho stresu by bol limitovaný na poškodzovanie biologických makromolekúl voľnými radikálmi. Nakoľko však výskum zaoberajúci sa redoxným prostredím v biologických systémoch v posledných dvoch dekádach dosiahol značný pokrok, bol tento biologický fenomén lepšie definovaný Deanom P. Jonesom v roku 2006 ako: „narušenie redoxnej kontroly a signalizácie.“ (Jones*, 2006). Nedávno bol Siesom tento termín redefinovaný ako: „stav, kedy je bunka vystavená suprafyziologickej oxidatívnej výzve, vedúcej k narušeniu redoxnej signalizácie a poškodeniu biomolekúl. Sies ďalej v práci označuje tento stav ako oxidatívny distress (Sies*, 2018). Vo veľkom počte vedeckých článkov bolo preukázané, že oxidatívny stres a poškodenie s ním spojené figuruje v celej škále života ohrozujúcich patológií vrátane ischemie, hypertenzie, chronických zápalových ochorení, astmy, rakoviny, neurodegeneratívnych ochorení a ďalších (Birben* et al., 2012). Počas oxidatívnej výzvy dochádza taktiež k aktivácii imunitného systému, výsledkom čoho sú produkované cytokíny, medzi ktoré patria interleukíny (IL), tumor nekrotizujúce faktory (TNFs), interferóny, prostaglandíny, leukotriény. To vedie k rôznym moduláciám signalizačných dráh, vo výsledku čoho môže dôjsť k rozvoju niektorých patológií (Lo et al., 1996)

2.1 Poškodenie lipidov prostredníctvom ROS

Lipidy sú jedny z makromolekúl, ktoré sú poškodzované v dôsledku oxidatívneho stresu v procese zvanom peroxidácia lipidov alebo lipoperoxidácia. V princípe dochádza k narušeniu zoskupenia tukov vo fosfolipidovej dvojvrstve, ktorá predstavuje rozhranie medzi bunkou a prostredím. Takto je porušená jej primárna, protektívna funkcia a mimo iného môže poškodenie lipidov v rámci fosfolipidovej dvojvrstvy viesť aj k inaktivácii proteínov, ktoré sú v tejto membráne integrované alebo sú v nej zakotvené. Rovnakým spôsobom dochádza aj k poškodeniu lipoproteínových partikulí (Birben* et al., 2012). Peroxidácia lipidov je typicky sprostredkovaná pomocou $\bullet\text{OH}$ ktorý je reaktívny voči polynenasýteným masným kyselinám s delokalizovaný systémom dvojitých väzieb (Kukreja et al., 1988). Mechanizmus peroxidácie lipidov spočíva v odštiepení vodíka metylovej skupiny v blízkosti delokalizovaného systému prostredníctvom $\bullet\text{OH}$, čím vzniká radikál v rámci molekuly MK. Takýto medziprodukt je následne atakovaný molekulou O_2 , v dôsledku čoho prechodne vzniká peroxylový radikál, ktorý môže byť ďalej spontánne štiepený na masné aldehydy, napríklad 2-hydroxynonenal či 4-hydroxynonenal, a ďalšie produkty ako je napríklad malondialdehyd (MDA, vid' schéma 2)(Birben* et al., 2012). Malondialdehyd navyše vykazuje reaktivitu voči dusíkatým bázam v štruktúre DNA, výsledkom čoho dochádza k ich modifikácii, a teda k poškodeniu samotnej DNA (Niedernhofer et al.,

2003). Rovnako bolo dokázané, že v súvislosti s lipoperoxidáciou, dochádza k poškodzovaniu proteínov, a to prostredníctvom väzby produktov oxidácie polynenasýtených kyselín na lyzínové zbytky proteínov (Refsgaard et al. 2000). Vzhľadom na to, že počas peroxidácie lipidov v bunke nedochádza len k narúšaniu lipidických štruktúr, ale aj k poškodzovaniu iných biomakromolekúl, je možné konštatovať, že sa jedná o obzvlášť škodlivý proces .

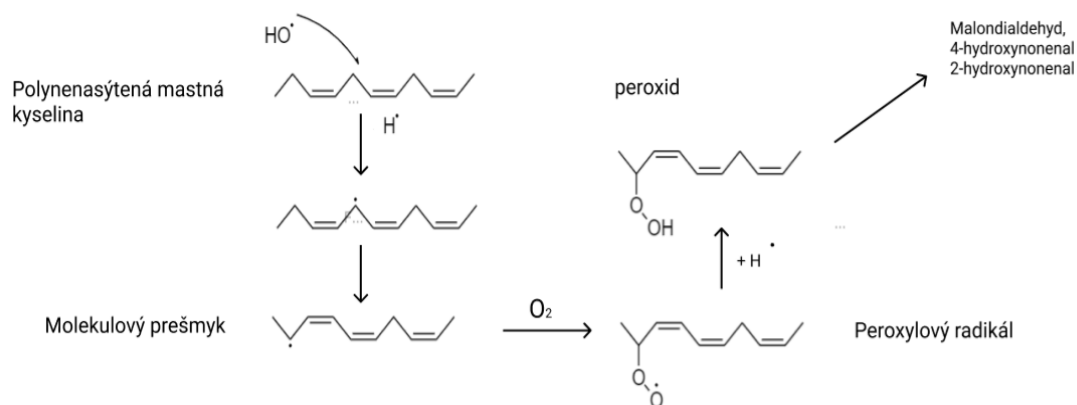


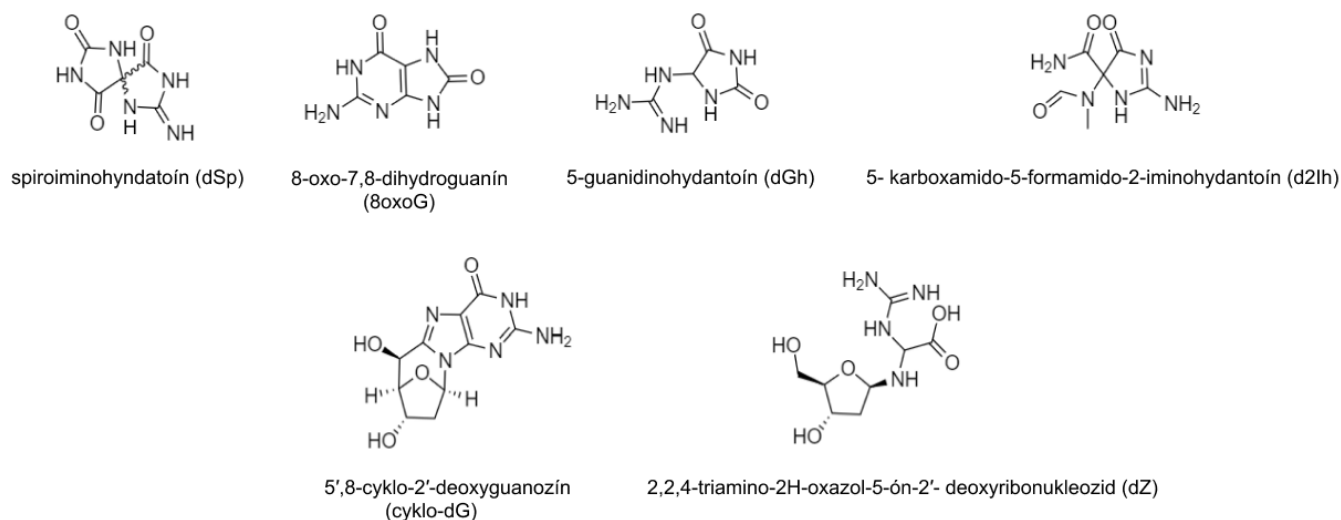
Schéma 2- Chemický zápis reakcií figurujúcich v procese peroxidácie lipidov. V prítomnosti hydroxylového radikálu dochádza ku sledu radikálových reakcií, výsledkom čoho je MK naštiepená na toxické produkty. V bode, kedy vzniká peroxylový radikál, môže teoreticky dochádzať k reťazovej reakcii, nakoľko dokáže utrhnúť vodík so susediacich uhlíkov v rámci uhlíkovej kostry. Vodíkový radikál však môže prijímať i z okolia. Prevzaté a upravené podľa (Birben* et al., 2012)

2.2 Poškodenie proteínov prostredníctvom ROS

K oxidatívne mu poškodeniu proteínov, rovnako ako v prípade lipidov, dochádza najmä prostredníctvom •OH. Hydroxylový radikál reaguje s aminokyselinovými zbytkami v štruktúre proteínu, pričom v týchto miestach dochádza ku vzniku hydroperoxidových skupín. Ďalej sa ukázalo, že k tejto modifikácii sú najviac citlivé valín, prolín, leucín, izoleucín, lyzín a glutamát (Gebicki et al., 1993). Mechanizmus oxidácie proteínov sa nápadite podobá na lipoperoxidáciu, nakoľko prvým krokom je odštiepenie α -vodíka z aminokyselinového zbytku prostredníctvom •OH, pričom vzniká alkylový radikál. Ten je rýchlo napadnutý molekulou kyslíka, pričom vzniká alkylperoxid, ktorý sa následne premieňa na alkoxylový radikál. Tento radikál môže byť ďalej premenený na hydroperoxid alebo eventuálne môže vznikáť hydroxylový derivát proteínu. Medziprodukty vznikajúce v tejto radikálovej reakcii môžu však reagovať s aminokyselinovými zbytkami v okolí a tvoriť tak ďalšie uhlíkové radikály. Vo výsledku môže dochádzať ku fragmentácii či ku krížovej väzbe proteínu (Berlett* et al., 1997). Taktiež bolo zistené, že hydroperoxidové skupiny proteínov dokážu reagovať s nukleosidmi DNA, dôsledkom čoho dochádza k zosieťovaniu týchto molekúl (*crosslinking*)(Gebicki et al., 1999). Takto modifikované proteíny sú však rýchlo podrobené degradácii v proteazóme (Grune et al., 1996), pravdepodobne v súvislosti s tým, aby sa nepropagovalo oxidatívne poškodenie.

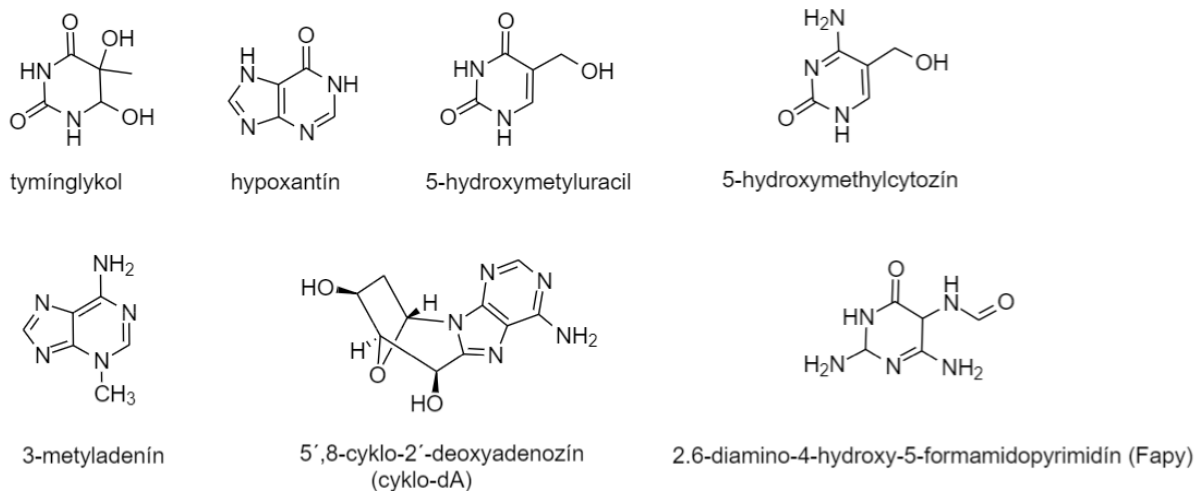
2.3 Poškodenie DNA prostredníctvom ROS

Medzi biomakromolekuly, ktoré sú poškádzované prooxidantami patrí aj DNA. Dochádza k tomu v dôsledku modifikácii v štruktúre nukleotidov, ktoré predstavujú základné stavebné bloky molekuly DNA. Dokonca aj za fyziologických podmienok dochádza denne ku veľkému množstvu oxidatívnych útokov na nukleotidy inkorporované v molekule DNA, ale za týchto podmienok je väčšina vzniknutých mutácií opravená reparačnými mechanizmami. Počas oxidatívneho stresu, však dochádza k týmto útokom s väčšou pravdepodobnosťou a opravné mechanizmy môžu byť nedostačujúce. Výsledkom toho na molekule DNA zostávajú modifikované nukleotidy, čo môže viesť k zmene primárnej sekvencie DNA (Burrows*, 2009). Najčastejšou z týchto modifikácií, ku ktorým dochádza v súvislosti s ROS, je oxidácia guanínu (G) na 8-oxo-7,8-dihydroguanín (8-oxoG) prostredníctvom singletového kyslíku (1O_2) (Devasagayam et al., 1991) či $\bullet OH$ (Nunoshiba et al., 1999). Modifikovanie prirodzeného guanínu na 8-oxoG pritom môže viesť ku zmene typického párovania G→C na 8-oxoG →A, tzn. dochádza k transverzii. Po replikácii a bunkovom delení tak dochádza k zmene v primárnej sekvencii DNA, čo môže v konečnom dôsledku, v závislosti od biologického kontextu danej sekvencie, viesť k inaktivácii proteínu alebo k atenuácii regulačného regiónu (Guo et al., 2017). Pri reakcii $\bullet OH$ s guanozínom vznikajú i ďalšie deriváty, vrátane spiroiminodihydantoínu (dSp), 5-guanidinohydantoínu (dGh), 2,2,4-triamino-2H-oxazol-5-ón-2'-deoxyribonucleozid (dZ), 5-karboxamido-5-formamido-2-iminohydantoín (d2Ih), 5',8-cyklo-2'-deoxyguanozín (cyklo-dG) (vid' obrázok 2) (Alshykhly et al., 2015). V súvislosti s produktami lipoperoxidácie, taktiež môže dochádzať ku vzniku intramolekulárnych väzieb medzi vláknami DNA duplexu, ktoré predstavujú problém v biologických procesoch, kedy dochádza k odvíjaniu DNA dvojvlákna (Kozekov et al., 2003).



Obrázok 2- Chemický zápis derivátov guanínu a guanozínu vznikajúcich reakciou s $\bullet OH$.
Prevzaté a upravené podľa (Alshykhly et al., 2015)

Okrem vyššie uvedených modifikácií guanínu môžu, v redoxných reakciách riadených reaktivitou ROS, vznikajú aj deriváty iných dusíkatých báz. Krátky a neúplný prehľad modifikácií dusíkatých báz je uvedený v obr. 2 (Birben* et al., 2012).



Obrázok 3- Chemický zápis ďalších derivátov dusíkatých báz vznikajúcich činnosťou ROS. Prevzaté a upravené podľa (Birben* et al., 2012)

3. Redoxná signalizácia

ROS boli dlhú dobu vnímané ako nežiadúce produkty aeróbného metabolizmu či ako prostriedok boja proti patogénom, ktoré majú na organizmus výhradne škodlivý dopad. S objavom izoenzýmov z podrodiny Nox sa však začalo od tejto hypotézy odvracať, nakoľko sa zistilo, že sú exprimované i v nefagocytárnych bunkách (Lambeth*, 2004). Roky venované výskumu ROS a ich dopadom na organizmus ukázali, že potenciónálna hrozba vyplývajúca z prítomnosti týchto zlúčenín *in vivo* je závislá na ich koncentrácii. Udržiavanie nízkej, fyziologickej koncentrácie ROS v bunkách je nevyhnutné pre široké spektrum biologických procesov regulovaných prostredníctvom redoxnej signalizácie. Medzi tieto procesy patrí napríklad bunková proliferácia či diferenciácia, z čoho vyplýva, že udržiavanie nízkej hladiny ROS, označovanej aj ako „oxidatívny eustres“, je životne dôležité (Mittler*, 2017; Sies*, 2018). Redoxná signalizácia a s ňou spojený oxidatívny eustres je regulovaný na viacerých úrovniach, vrátane produkcie ROS prostredníctvom enzýmov z rodiny Nox a v dýchacom reťazci, pričom je nutné aby dochádzalo k ich efektívnemu odbúraniu prostredníctvom antioxidantných systémov (Sies* et al., 2017). Za fyziologických podmienok, v rámci oxidatívneho eustresu, sa v cytoplazme H_2O_2 vyskytuje v koncentrácii asi 1-10mM. Zvýšenie hladiny H_2O_2 nad túto hodnotu aktivuje „adaptívne stresové reakcie“, ktoré sprostredkujú transkripčné faktory Nrf2 (z orig. nuclear factor erythroid 2-related factor 2) alebo NF- κ B. (nukleárny faktor κ B) Výrazné zvýšenie intracelulárnej koncentrácie H_2O_2 (<100mM) vedie k poškodzovaniu biomolekúl a označujeme ho ako oxidatívny distres (viď. kapitola 2)(Sies*, 2017).

Centrálnou molekulou figurujúcou v redoxnej signalizácii, ktorá je zároveň druhým poslom (*second messenger*) v signalizačných kaskádach, je H_2O_2 . Peroxid vodíka, ako jeden z mála ROS, je schopný voľne difundovať cez membrány, a na rozdiel od ostatných ROS vykazuje relatívne nízku reaktivitu (viď tabuľka 1)(Sies* et al., 2017). Vzhľadom na túto charakteristiku predstavuje H_2O_2 najvhodnejšiu molekulu spomedzi ROS slúžiacu na sprostredkovanie prenosu signálu v rámci redoxnej signalizácie.

V rámci tejto signalizácie dochádza k prenosu signálu pomocou redoxne aktívnych cysteínových zbytkov v štruktúrach proteínov. Za fyziologických podmienok sa väčšina týchto zbytkov vyskytuje v redukovanom stave, tzn. obsahujú sulfhydrylovú skupinu -SH (označované aj tiolové skupiny). Počas oxidatívnej záťaže však môžu byť tiolové zbytky oxidované na sulfonátové, sulfínátové či sulfenátové formy. Tieto proteíny tak predstavujú typ redoxných senzorov bunky. U niektorých proteínov je nutné tieto oxidované formy spätne redukovať prostredníctvom antioxidantných systémov, aby nedochádzalo k tvorbe nežiadúcich intramolekulárných disulfidových mostíkov alebo k disulfidickým interakciám so zlúčeninami obsahujúcimi tiolové zbytky. U iných naopak súvisí modifikácia tiolových zbytkov s prenosom

signálu v rámci signalizačných dráh regulujúcich fundamentálne bunkové procesy ako je diferenciácia, proliferácia, adaptívna odpoveď na oxidatívny stres či bunková obrana (Na* et al., 2007)

Iným príkladom môže byť regulácia signalizačnej ERK/MAP kinázovej dráhy, ktorá je sprostredkovaná pomocou oxidatívneho eustresu. K aktivácii tejto dráhy dochádza pri stimulácii receptorov pre epidermálny rastový faktor (EGF, epidermálny rastový faktor) a rastový faktor odvodený od krvných doštičiek (PDGF, rastový faktor odvodený od krvných doštičiek)(Ramos*, 2008). Tieto receptory spadajú do kategórie receptorových tyrozín kináz (RTKs), ktoré po naviazaní ligandu na extracelulárnej strane vykazujú katalytickú aktivitu v jeho intracelulárnej časti. Naviazanie ligandu na receptor, v prípade EGFR (receptor pre EGF) a PDGFR (receptor pre PDGF), navyše spôsobuje jeho dimerizáciu, čo vedie k autofosforylácii špecifických tyrozínov v intracelulárnej časti receptora. Takáto modifikácia dovoľuje interakciu s SH2 (Src homológy 2) doménami proteínov, ktoré prenášajú signál ďalej (Case et al., 1994). V súvislosti s väzbou ligandu, taktiež dochádza k produkcii H₂O₂, ktorý sprostredkúva reverzibilnú oxidáciu príslušných proteínových tyrozínových fosfatáz (PTP), čím ich inaktivuje a zabráni tak defosforylácii modifikovaných tyrozínových zvyškov na EGFR a PDGFR (Soo Bae et al., 1997; Sundaresan et al., 1995). Z toho vyplýva, že naviazanie proteínov s SH2 doménami a ďalšia transdukcia signálu je priamo závislá na potranslačných modifikáciách sprostredkovaných pomocou ROS.

3.1 *Transkripčný faktor Nrf2*

Nrf2 (z anj. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) patrí do podrodiny základných leucínových zipsov (bZIP) s názvom Cap 'n' Collar (CNC), sumárne (CNC-bZIP). Jedná sa o DNA-väzobné transkripčné faktory, ktoré slúžia ako silné aktivátory RNA polymerázy II (Moi et al., 1994). V štruktúre Nrf2 sa vyskytuje 7 domén, menovite Neh1-Neh7 (Nrf2-ECH homológy), pričom DNA-väzobnou doménou je Neh1, ktorá je v tejto podrodine dobre konzervovaná (Itoh et al., 1999; Wang et al., 2013). V prípade Nrf2, DNA-väzobná doména interaguje s ARE (antioxidačne responzívny element) sekvenciou lemujúcu 5' koncové oblasti génov pre enzýmy spadajúce do kategórie detoxifikačných enzýmov druhej fázy, medzi ktoré patrí napríklad NAD(P)H:chinón oxidoreduktáza 1 (NQO1) a hém oxygenáza 1 (HO-1). Sekvencia ARE tu slúži ako regulačný element transkripcie génov pre vyššie uvedené proteíny, ktorých exprimácia je závislá na väzbe Nrf2 (Hong et al., 2010). Za fyziologických podmienok sa Nrf2 nachádza v cytoplazme v komplexe s proteínom Keap1 (Kelch-like ECH associated protein 1), ktorý zabraňuje jeho translokácii do jadra, a tým pádom aj zamedzuje aktivácii transkripcie génov pod vplyvom ARE (Itoh et al., 1999). Keap1 proteín sa radí medzi tzv. substrátové adaptorové proteíny, ktorých funkciou je označenie špecifického substrátu k ubikvitinácii, dôsledkom čoho sú následne degradované v proteazóme. Keap1, mimo jeho

väzby s Nrf2, slüži aj ako adaptorový proteín pre Cullin 3/RING-box protein 1 (Cul3/Rbx1) komplex, ktorý mierne posilňuje ubikvitináciu Nrf2 vedúcu k jeho degradácii v proteazóme (Kobayashi et al., 2004). Zhang a jeho kolektív naproti tomu navrhli, že úloha komplexu Cul3/Rbx1 spočíva v tom, že počas oxidatívneho stresu ubikvitinuje Keap1, pričom dochádza k degradácii Keap1 na proteazóme nezávislou cestou (Zhang et al., 2005). Na základe týchto výsledkov je možné konštatovať, že Keap1 v tejto signálnej dráhe vystupuje za fyziologických podmienok ako negatívny regulátor Nrf2, výsledkom čoho je zablokovaná aktivácia transkripcie génov pod vplyvom ARE. Naopak v prípade, že dôjde k oxidatívnej záťaži, Keap1 je ubikvitinovaný prostredníctvom Cul3/Rbx1 komplexu, výsledkom čoho je degradovaný a môže dôjsť k exprimácii génov pre proteíny figurujúce v antioxidačných procesoch. Z toho jasne vyplýva, že aktivácia Nrf2 predstavuje adaptívnu odpoveď na oxidatívny stres.

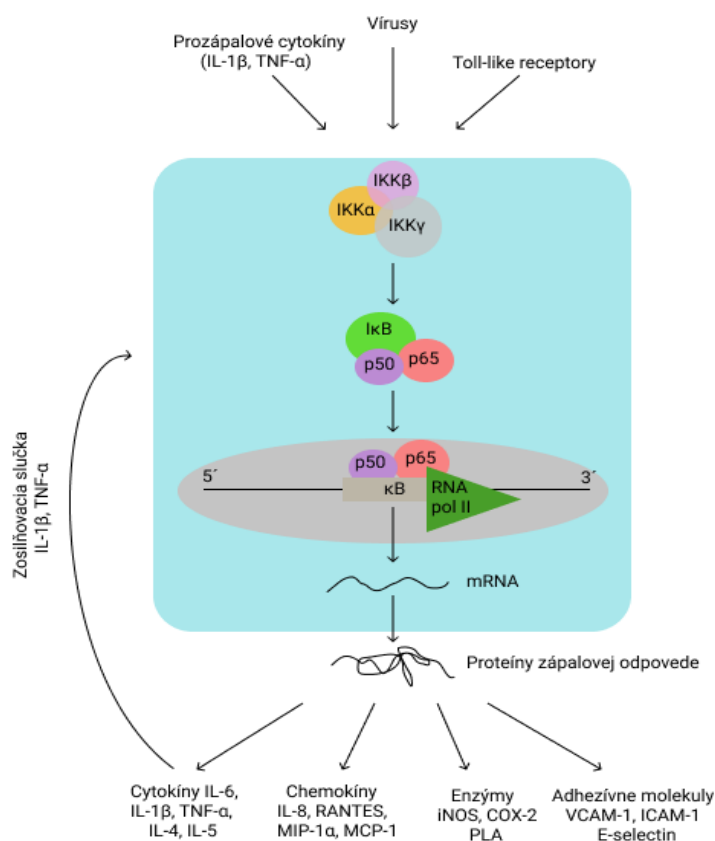
3.2 Transkripčný faktor NF- κ B

NF- κ B je redoxne senzitívny transkripčný faktor podieľajúci sa na sprostredkovaní zápalovej odpovede, proliferácie, diferenciácie a apoptózy bunky. Tento faktor pozostáva vždy z dvoch podjednotiek, ktoré sa viažu na κ B sekvenčné motívy DNA, čím aktivujú transkripciu cieľových génov. Podjednotky NF- κ B pozostávajú z proteínov p50, p52, p65 (RelA), RelB a cRel obsahujúcich tzv. RHD (domény homológne s Rel), prostredníctvom ktorej sa viažu na DNA (Na* et al., 2007). V neaktívnej forme je na dimér NF- κ B naviazaný aj I κ B (inhibitor jadrového faktora κ B), ktorý zakrýva NLS (nuclear localization signal), čím zabraňujú diméru translokovať sa do jadra (Nolan et al., 1991). Bolo dokázané, že v konkrétnych diméroch sa zväčša vyskytuje aspoň p50 alebo p65, pričom u mutantov deficientných v oboch génoch pre tieto proteíny, bola zaznamenaná len veľmi slabá aktivácia transkripcie cieľových génov. Aktivácia špecifickej podmnožiny NF- κ B responzívnych génov je závislá od konkrétneho stimulu, ktorý bunka obdrží (Hoffmann et al. 2003). V súlade s kapacitným obmedzením práce, bude opísaná iba klasická cesta aktivácia NF- κ B, sprostredkovaná pomocou prozápalových cytokínov (TNF α , IL-1 β) (Beg et al., 1993), nakoľko k nej dochádza v súvislosti s aktiváciou imunitnej odpovede na vírusové infekcie. Je nutné si však uvedomiť, že cesta aktivácie NF- κ B sa v rozličných typoch buniek a pri rôznych stimuloch môže výrazne líšiť. Aktivácia klasickej cesty môže byť taktiež sprostredkovaná stimuláciou Toll-like receptorov (TLRs)(Lee et al., 2006) či RLR (RIG-I, MDA5) (Dong et al., 2013).

Dráha aktivácie NF- κ B môže byť dobre demonštrovaná pri stimulácii receptora pre IL-1. Po interakcii receptora s týmto ligandom, dochádza k väzbe proteínu MyD88 na receptor, ktorý slüži ako adaptorový proteín pre IRAK1 (IL-1 receptor-associated kinase)(Wesche et al., 1997). IRAK1 je v dôsledku tejto interakcie fosforylovaný, výsledkom čoho asociuje s TRAF6 (TNF receptor associated factor 6)(Komplex I), čím vzniká prechodný komplex na receptore,

ktorý následne disociuje z receptora a asociuje na membráne s proteínami TAK1, TAB1 a TAB2 (Komplex II). V rámci tohto komplexu dochádza k fosforylácii TAK1 a TAB2, následkom ktorej dochádza k disociácii komplexu TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2 (komplex III) do cytoplazmy. V cytoplazme ďalej dochádza k aktivácii TAK1, ktorá je pravdepodobne závislá na ďalších cytozolických faktoroch. Akonáhle je však TAK1 aktivovaná dochádza k priamej stimulácii kinázovej aktivity IKK (I κ B-kináza) komplexu (Jiang et al., 2002). Ten vo svojej štruktúre obsahuje kostrový (*scaffold*) proteín NEMO (NF- κ B essential modulator, ozn. aj IKK γ)(Yamaoka et al., 1998) a kinázy IKK α a IKK β (Zandi et al., 1997). Výsledkom aktivácie IKK, dochádza ku fosforylácii špecifických serínov na molekule I κ B, menovite Ser³² a Ser³⁶, čo vedie k uvoľneniu I κ B z NF- κ B, ktorý v neprítomnosti jeho inhibítora môže translokovať do jadra a spúšťať transkripciu NF- κ B-responzívnych génov. Naviac sa zistilo, že samotná fosforylácia nevedie k degradácii I κ B, ale dovoľuje ubiquitináciu tohto inhibítora, výsledkom čoho k degradácii dochádza (Didonato et al., 1996; Traenckner et al., 1995).

Ďalej bolo navrhnuté, že väzobná schopnosť NF- κ B na DNA je priamo závislá na redoxnej regulácii. Vo väzobnom mieste podjednotky p50 NF- κ B sa totiž nachádza redoxne senzitivný cysteín (Cys⁶²), ktorý sa v cytoplazme nachádza v oxidovanom stave. Po tom ako dôjde k aktivácii a translokácii NF- κ B do jadra, je však tento cysteín redukovaný, výsledkom čoho môže dôjsť k väzbe do sekvencie κ B (Nishi et al., 2002). Taktiež sa zistilo, že aktivácia NF- κ B prostredníctvom TNF α je výrazne posilnená pri zvýšenej koncentrácii H₂O₂. Peroxid vodíka totiž sprostredkúva fosforyláciu špecifických serínových zbytkov na IKK α a IKK β (Kamata et al., 2002). V súvislosti s týmto a so skutočnosťou, že antioxidantné zlúčeniny sa aktívne podieľajú na sprostredkovaní funkcie NF- κ B (Nishi et al., 2002), je možné konštatovať, že redoxná regulácia predstavuje dôležitý prvok v signalizačnej dráhe vedúcej k aktivácii NF- κ B.



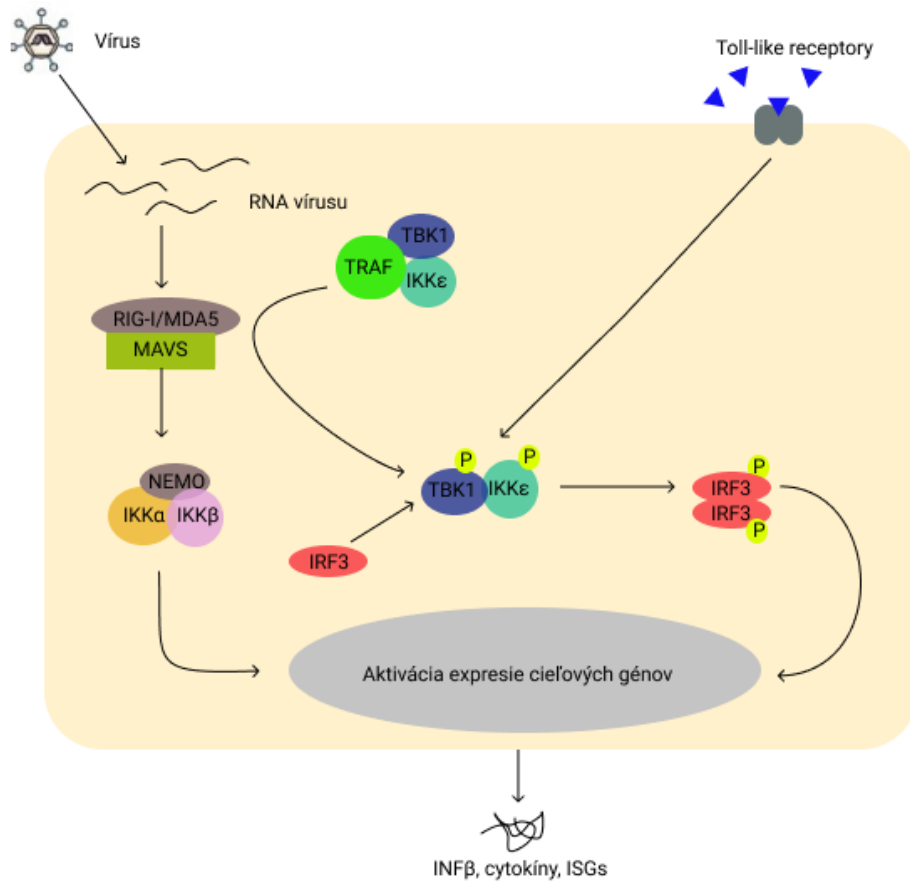
Obrázok 4- Grafické znázornenie aktivácie klasickej NF- κ B cesty.

V závislosti od stimulu, ktorý bunka obdrží, dochádza k aktivácii signalizačnej kaskády, v dôsledku čoho je aktivovaná transkripcia špecifickej podmnožiny NF- κ B responzívnych génov.

3.3 *Interferón regulujúci faktor 3 (IRF3)*

IRF3 je dôležitým aktivátorom transkripcie génov pre IFN- β (Sato et al., 1998), IFN- γ , IL-6 (Moore et al., 2013), IL-8 (Wagoner et al., 2007) a IL-10 (Samanta et al., 2008). K aktivácii IRF3, či iných transkripčných faktorov figurujúcich v zápalových odpovediach, môže dôjsť prostredníctvom signalizačných dráh sprostredkovaných stimuláciou PRR (receptory rozpoznávajúce vzorce patogénov). Do tejto skupiny receptorov spadá aj podrodina RLR (receptory podobné RIG-I), do ktorej patria receptory RIG-I (gén I indukovateľný kyselinou retinovou) a MDA5 (proteín 5 asociovaný s diferenciáciou melanómu). Tieto receptory sú charakteristické tým, že dokážu detegovať vírusové RNA, a tak zahájiť signalizačnú kaskádu vedúcu k aktivácii IRF3 či NF- κ B (Dong et al., 2013). Yoneyama s kolektívom navrhli, že táto dráha je zahájená pri stimulácii RIG-I prostredníctvom dsRNA (dvojvláknová RNA), pričom dochádza k zmene konformácie receptora, výsledkom čoho je možné transdukovať signál ďalej pomocou CARD (Caspase activation and recruitment domains) domény RIG-I (Yoneyama et al., 2004). Tento signál je pravdepodobne prenášaný prostredníctvom interakcie medzi CARD doménou RIG-I a rovnakej domény v rámci proteínu MAVS (mitochondrial antiviral signaling) (Seth et al., 2005), ktorý je taktiež označovaný ako IPS-1 (Kawai et al., 2005), VISA (Xu et al., 2005) alebo Cardif (Meylan et al., 2005). V signalizačnej dráhe ďalej figurujú TRAF proteíny, ktoré v cytoplazme asociujú s TBK1 (TANK-binding protein 1) a IKK ϵ (IkB kináza- ϵ), výsledkom čoho vzniká komplex TRAF-TBK1-IKK ϵ . Ten je následne regrutovaný pomocou MAVS, pričom sú TBK1 a IKK ϵ v dôsledku tejto interakcie autofosforylované. TRAF taktiež sprostredkúva aktiváciu NEMO, ktorá vedie k aktivácii NF- κ B a ďalšej fosforylácii TBK1-IKK ϵ , výsledkom čoho je aktivovaný i transkripčný faktor IRF3 (Fang et al., 2017). Naviac bolo demonštrované, že kinázy TBK1 a IKK ϵ figurujú aj v signalizačnej kaskáde aktivovanej prostredníctvom stimulácie TLR3, v ktorej predstavujú esenciálne komponenty aktivujúce IRF3 (Fitzgerald et al., 2003).

Bolo naviac preukázané, že aktivácia IRF3 a expresia IFN- β je priamo závislá na funkcii Nox2. Výsledkom jej aktivity dochádza, k produkcii ROS, ktoré sprostredkujú fosforyláciu a následnú dimerizáciu RIG-I a naviac podporujú expresiu proteínu MAVS, čím dovoľujú efektívnu transdukcii signálu vedúcu k aktivácii IRF3 (Soucy-Faulkner et al., 2010).



Obrázok 5- Schematické znázornenie vyššie uvedených signálnych kaskád aktivujúcich NF-κB a IRF3. Aktivácia NF-κB i IRF3 môže byť sprostredkovaná pomocou RLR, pričom signálne dráhy divergujú v bode, kedy ďalšiu transdukciu signálu zaobstaráva adaptorový proteín MAVS.

4. Modulácie redoxnej homeostázy prostredníctvom vírusov

Prvá práca venovaná tejto problematike bola publikovaná v roku 1979, kedy Ernst Peterhans vo svojich pokusoch dokázal, že v bunkách infikovaných Sendai vírusom (SeV) je indukovaná tvorba prooxidantov. To sa mu podarilo prostredníctvom chemiluminiscencie, ktorá bola vyvolaná reakciou prooxidantu s fluorochrómom luminolom, krátko po tom ako boli bunky myšacej sleziny infikované SeV. Skutočnosť, že tvorba prooxidantov je sprostredkovaná pomocou bunkových procesov, podporil dvomi pokusmi. V jednom z nich demonštroval, že Sendai vírus v roztoku s luminolom v neprítomnosti buniek nevykazuje žiadnu chemiluminiscenciu a v druhom ukázal, že tento jav je závislý od väzby viriónu na receptor, a teda, že tvorba prooxidantov vzniká ako odpoveď bunky na cudzorodé glykoproteíny. Naviac, už v tom období vo svojej publikácii uvádza, že za produkciu prooxidantov môže byť zodpovedná NADPH oxidáza (Peterhans, 1979). Vo svojich pokusoch s chemiluminiscenciou závislou na bunkovej produkcii prooxidantov pokračoval a v roku 1980 publikoval článok, kde podporil svoju myšlienku, že tvorba prooxidantov je indukovaná prostredníctvom interakcie vírusových glykoproteínov s membránou bunky. Ako kľúčovú molekulu v tomto procese charakterizoval hemaglutinín, obalový glykoproteín nachádzajúci sa na kapside vírusu chrípky i SeV (Peterhans, 1980). Ďalej v roku 1987 publikoval so svojim kolektívom ďalší článok, v ktorom na základe experimentálnych dát popísal ďalší mechanizmus ako môže k indukcii prooxidantov dochádzať pri infekcii buniek Berne vírusom. V polymorfonukleárných leukocytoch (PMNL) infikovaných Berne vírusom demonštroval cestu tzv. priamej indukcie, ktorá je závislá na väzbe protilátok na antigény vírusovej kapsidy. Druhý spôsob, nezávislý na väzbe protilátky na antigén, ktorý už opísal vo svojich predošlých experimentoch z roku 1979 a 1980, tu označil ako tzv. alternatívnu cestu indukcie prooxidantov (Peterhans, 1979, 1980; Peterhans et al., 1987). E. Peterhans týmto spôsobom významne ovplyvnil budúce smerovanie výskumu týkajúceho sa vírusov a s nimi spojenými ochoreniami, ktoré otvorili dvere novým metodologickým a terapeutickým prístupom.

Od konca sedemdesiatych rokov, kedy E. Peterhans prišiel s vyššie popísanými objavmi, bolo dodnes odpublikované množstvo článkov, ktoré sa zaoberajú problematikou oxidatívneho stresu vyvolaného vírusovými infekciami. So zreteľom na túto skutočnosť, budú niektoré cesty, prostredníctvom ktorých dochádza k modulácii redoxnej homeostázy vírusovou infekciou, objasnené v podkapitolách venovaných konkrétnym vírusom.

4.1 Vírusové ochorenia dýchacích ciest

Vírusy napádajúce dýchacie cesty sú celosvetovo rozšírenými infekčnými agens, ktoré sa súhrnne označujú ako respiračné vírusy (z anj. respiratory viruses, RV). Ochorenia s nimi spojené sa obyčajne prejavujú symptómami bežného nachladnutia, ktoré významne prispievajú k celosvetovej morbidite. Z epidemiologického hľadiska dochádza k nárastu prevalencie sezónne, vždy na jar a v zime, ale nemusí to byť pravidlom pre všetky RV (Nichols* et al., 2008). Do tejto skupiny vírusov sa radí vírus chrípky (Influenza virus, IV), ľudský respiračný syncyálny vírus (HRSV), ľudský rhinovírus (HRV), ľudský metapneumovírus (HMPV), Sendai vírus (SeV), adenovírusy a v neposlednom rade koronavírusy (Khomich* et al., 2018). Bolo dokázané, že mimo ťažkostí, ktoré sú spôsobené priamo replikáciou týchto vírusov, zhoršujú stav pacientov postihnutých chronickými pľúcnymi ochoreniami, medzi ktoré patrí chronická obštrukčná choroba pľúc (COPD)(Camargo et al., 2008), astma (Nicholson et al., 1993) a cystická fibróza (CF)(Etherington et al., 2014). V nasledujúcich odstavcoch bude opísané, akými spôsobmi dochádza počas infekcií niektorými RV k narušeniu redoxnej homeostázy a k navodeniu oxidatívneho stresu.

Veľká frakcia ROS vznikajúcich v súvislosti s chrípkovou infekciou sú výsledkom činnosti Duox2 enzýmov, ktoré sú exprimované, mimo iné, v bunkách dýchacieho epitelu. Tento fakt potvrdzujú dáta z dvoch nezávislých výskumov, ktoré navyše ukazujú, že kontrola IV infekcie je priamo závislá na prítomnosti týchto NADPH oxidáz v napadnutých bunkách (Kim et al., 2015; Strengert et al., 2014). Výskum z roku 2015 ďalej poukazuje na to, že funkcia peroxidu vodíka, produkovaného prostredníctvom Duox2, nie je limitovaná čisto na jeho antimikrobiálne účinky, ale že v tomto biologickom kontexte funguje aj ako druhý posol. Výsledky ich experimentov poukazujú na to, že na H₂O₂, ktorý je produkovaný prostredníctvom Duox2, je závislá aj aktivácia transkripcie génov pre RIG-I a MDA5 (Kim et al., 2015). Z toho vyplýva, že pri infekcii IV hrá H₂O₂ kľúčovú molekulu, ktorá sprostredkúva činnosť vrodenej imunity na viacerých úrovniach. Aktivácia tohto typu vrodenej imunitnej odpovede bola zaznamenaná aj u buniek infikovaných HRV, HRSV, SeV (Fink et al., 2008; Slater et al., 2010). Na druhej strane však pri infekcii buniek respiračného traktu vírusom chrípky dochádza k zvýšenej produkcii O₂^{•-} výsledkom činnosti XO (Akaike et al., 1990) a NOX4 (Amatore et al., 2015), a navyše dochádza aj k aktivácii iNOS a Nox2 v alveolárnych fagocytárnych bunkách. Medzi molekulami O₂^{•-} a NO môže v dýchacích cestách dochádzať k chemickej reakcii za vzniku peroxynitritu, ktorý následne reaguje s bunkovými zložkami. Škodlivý efekt ONOO⁻ na okolité tkanivá tak môže predstavovať faktor patogenicity IV (Akaike et al., 1996). Túto hypotézu podporujú nálezy na pľúcach pacientov trpiacich pneumóniou, spôsobenou pandemickou H1N1 chrípkou, ktoré vykazovali známky oxido-nitrozatívneho poškodenia (Nin et al., 2012). Rovnako štúdie, ktoré sledovali dopad infekcie IV na respiračný systém myši, ktoré neexprimovali Nox2 či v myšiach s posilnenou expresiou SOD3, ukázali, že u týchto myši nedochádza k tak rozsiahlemu poškodeniu pľúc a dýchacích ciest ako u divokého kmeňa (Snelgrove et al., 2006; Suliman et al., 2001).

Počas infekcie HRSV dochádza taktiež k narušeniu redoxnej homeostázy, výsledkom čoho nastáva oxidatívneho stres vedúci k poškodeniu pľúc a dýchacích ciest (Moreno-Solís et al., 2017). Tento efekt je daný vplyvom infekcie na exprimáciu antioxidantných enzýmov, ktorá je regulovaná prostredníctvom Nrf2. Bolo totiž preukázané, že počas infekcie respiračným syncytiálnym vírusom dochádza k deacetylácii a následnej degradácii Nrf2, výsledkom čoho nie je aktivovaná adaptívna odpoveď na oxidatívny stres .

Počas infekcie ľudským metapneumovírusom (HMPV) boli v transkriptomickej štúdií, zaznamenané výrazné zmeny v exprimačnom profile epitelových buniek dýchacích ciest. V priebehu infekcie bola výrazne znížená produkcia antioxidantných enzýmov, vrátane mikrozomálnej glutatión S-transferázy 1 (MGST1) a MGST2, glutatión S-transferázy A4 (GSTA4), PRx1, PRx3 a PRx6. Naopak bola zaznamenaná zvýšená exprimácia génov pre chemokíny a cytokíny, ktoré sprostredkujú imunitnú odpoveď bunky. K zvýšenej exprimácii dochádza aj u génov pre transkripčné faktory ako sú NF- κ B či IRFs, ktoré pozitívne regulujú ďalšiu produkciu cytokínov a chemokínov. V ďalšom experimente tejto štúdie boli monitorované produkty biologickej oxidácie, ktoré slúžia ako indikátory oxidatívneho stresu v bunkách. Ich zvýšené hladiny jasne napovedajú, že v bunkách infikovaných HMPV dochádza k destabilizácii redoxnej homeostázy vedúcej k oxidatívne poškodeniu týchto buniek (Bao et al., 2008).

Pri infekcii epitelových buniek dýchacích ciest ľudským rinovírusom rovnako dochádza k nadprodukcii H₂O₂, v dôsledku čoho v nich nastáva oxidatívny stres (Camini et al., 2017). Tento stav vedie k aktivácii redoxne senzitivných regulátorov transkripcie ako sú napr. Nrf2 či NF- κ B (Gaudernak et al., 2002; Mihaylova et al., 2018). Aktivovaný NF- κ B pozitívne reguluje transkripciu cytokínov pri infekcii HRV, pričom vo veľkom množstve je produkovaný Interleukín-8 (Camini et al., 2017). Tento cytokín predstavuje dôležitý mediátor zápalovej odpovede v imunitných reakciách a ukázalo sa, že pozitívne reguluje aktiváciu NF- κ B a produkciu ďalších cytokínov vrátane IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α (Chan et al., 2017). Inhibícia aktivácie NF- κ B u HRV infikovaných buniek bola spozorovaná po pridaní NAC (N-acetylcysteín, antioxidant), pričom však nedošlo k poklesu hladín H₂O₂, ktoré v súvislosti s infekciou narástli (Biagioli et al., 1999). Pyrrolidín ditiokarbamat (PDTC), ako jediný z antioxidantov, dokonca blokoval replikáciu HRV (Gaudernak et al., 2002). Produkcia IL-8, bola taktiež zaznamenaná u IV (Choi et al., 1992) a HRSV. V prípade HRSV bolo demonštrované, že antioxidanty môžu produkciu IL-8 inhibovať (Mastrorarde et al., 1995). U pacientov so zhoršujúcimi sa príznakmi pľúcnych ochorení boli taktiež nahlásené zvýšene hladiny IL-8 (Papiris et al., 2018; Zhang et al., 2018), čo môže naznačovať, že tento cytokín a jeho regulácia pomocou NF- κ B hrá dôležitú rolu v patogenéze pľúcnych ochorení, ktorých priebeh je infekciami RV ovplyvnený.

4.2 *Vírus Hepatitídy C (HCV)*

K roku 2016 bola globálna prevencia HCV asi 2,5%, čo predstavuje zhruba 177,5 milióna nakazených dospelých jedincov (Petruzzello et al., 2016). V dôsledku infekcie vírusom Hepatitídy C pritom dochádza v niektorých prípadoch k rozvoju chronickej hepatitídy, cirhózy či hepatocelulárneho karcinómu. Mnohé štúdie označujú oxidatívny stres, vyvolaný infekciou HCV či nadmerným požívaním alkoholu, za hlavný patogenetický faktor v rozvoji týchto chorôb (Colell et al., 1998; Mahmood et al., 2004). Výskum zaoberajúci sa touto problematikou, začal v roku 1966, kedy Di Luzio prvýkrát experimentálne potvrdil, že po požití etanolu, dochádza ku lipoperoxidácii (Di Luzio, 1966). U piatich proteínov HCV, vrátane *core* proteínu, E1, E2, NS4B, NS5A, bolo preukázané, že stimulujú tvorbu ROS, výsledkom čoho dochádza k aktivácii Nrf2-dependentnej signalizácie. Ostatné proteíny (NS2, NS3, NS4A, NS5B, p7) túto aktiváciu *in vivo* nevykazujú (Ivanov et al., 2011).

Počas infekcie HCV dochádza k translokácii jeho *core* proteínu na vonkajšiu membránu mitochondrie. V súvislosti s prítomnosťou tohto proteínu na mitochondrii dochádza k selektívnej inhibícii komplexu I v mitochondriálnom transportnom reťazci, s čím je spojená nadmerná produkcia ROS. Mimo toho dochádza aj k nárastu koncentrácie GSSG v dôsledku poklesu NADPH v mitochondriách a k influxu Ca^{2+} iónov do tejto organely (Korenaga et al., 2005; Li et al., 2007).

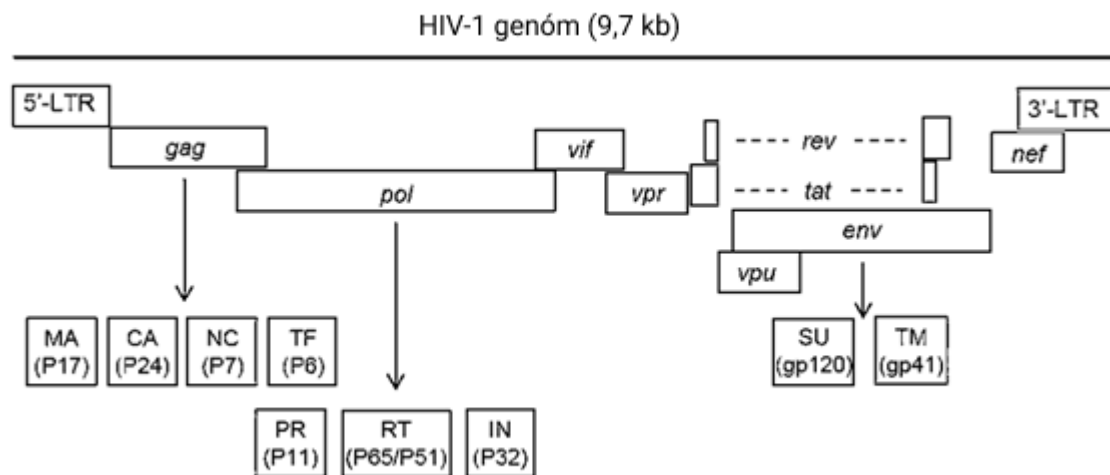
Proteín NS5A vo svojej štruktúre obsahuje amfipatický helix, vďaka ktorému môže byť lokalizovaný na membrány (Elazar et al., 2003). Gong a jeho kolektív, špekulujú, že lokalizácia NS5A súvisí s navodením ER-stresu, výsledkom čoho dochádza k efluxu Ca^{2+} z tejto organely (Gong et al., 2001). V súvislosti s efektom *core* proteínu na influx Ca^{2+} do mitochondrie (Li et al., 2007), je možné uvažovať, že tieto dva proteíny pracujú synergisticky v zmysle stimulácie tvorby ROS a navodenia oxidatívneho stresu, výsledkom čoho dochádza k aktivácii redox-senzitívneho transkripčného faktora NF- κ B (Gong et al., 2001). Naopak novšie experimenty Smirnovovej a kolektívu z roku 2016 ukazujú, že efekt Ca^{2+} na indukciu produkcie ROS je minoritný a navrhujú, že oxidatívny stres spojený s infekciou je daný aktiváciou transkripcie génov pre Nox1, Nox4 a cytochróm P450 (Smirnova et al., 2016). *Core* proteín a NS5A taktiež aktivujú transkripciu génu pre iNOS (García-Mediavilla et al., 2005), ktorý generuje NO reagujúci s O_2^- za vzniku ONOO $^-$ (Ma*, 2013). ONOO $^-$ a jeho deriváty môžu reagovať s tyrozínovými zbytkami na proteínoch, výsledkom čoho dochádza k akumulácii proteínov obsahujúcich nitrotyrozíny, ktoré indikujú nitrozatívny stres (García-Mediavilla et al., 2005).

Rovnako ako NS5A, aj NS4B je translokovaný na membránu ER a je spájaný s narúšaním intracelulárnej Ca^{2+} homeostázy a aktiváciou NF- κ B (Li et al., 2009). Bolo taktiež demonštrované, že mutácie v špecifických miestach génu pre NS4B, vedú k zníženiu efektivity replikácie HCV, čo priamo naznačuje že NS4B hrá v procese replikácie dôležitú rolu (Blight, 2011).

4.3 HIV-1 (vírus ľudskej imunodeficiencie 1)

Od roku 1983, kedy bola definitívne spojená HIV-1 infekcia s vývojom ochorenia AIDS (Acquired immunodeficiency syndrome)(Barre-Sinoussi et al., 1983), bol tomuto infekčnému agens venovaný intenzívny výskum. Ku rozvoju AIDS (syndróm nadobudnutej imunodeficiencie) u HIV+ pacientov dochádza z dôvodu poškodenia a strát buniek imunitného systému (Laurent-Crawford et al., 1991). Medzi permisívne bunky patria predovšetkým tie, čo exprimujú CD4 receptor a zároveň jeden z chemokínových koreceptorov, menovite CCR5 (C-C chemokínový receptor typu 5) alebo CXCR4 (C-X-C chemokínový receptor typu 4)(Simmons et al., 1998). V tomto kontexte bolo preukázané, že HIV-1 dokáže infikovať CD4+ lymfocyty, dendritické bunky, Langerhansové bunky, B lymfocyty, granulocyty a nervové bunky. Štúdie pritom poukazujú na to, že vo vývoji tohto ochorenia hrá dôležitú úlohu práve oxidatívny stres (Israël et al., 1997), a že pri podaní antioxidantných látok dochádza ku zníženiu replikačnej schopnosti HIV (Garaci et al., 1997). Túto skutočnosť ďalej podporuje fakt, že u pacientov koinfikovaných HCV/HIV dochádza ešte k väčšiemu poklesu GSH v postihnutých bunkách, čo vedie k posilneniu replikácie HIV (Shin et al., 2012).

Genóm HIV kóduje dokopy 15 proteínov, a to v rámci deviatich ORF (Open reading frame). Z troch ORF sú transkribované a následne translatované 3 polypeptidy *gag*, *pol*, *env*, ktoré sú ďalej štiepené na funkčné proteíny. Z polyproteinu *gag* a *env* vznikajú štruktúrne zložky virionu. Z *gag* polypeptidu konkrétne vznikajú proteíny MA (matrix), CA (capsid), NC (nucleocapsid) a p6 a z *env* SU (surface/gp120) a TM (transmembrane/gp41). Z polyproteinu *pol* vznikajú proteíny vykonávajúce základné enzymatické funkcie potrebné na propagáciu infekcie a to menovite PR (proteáza), RT (reverzná transkriptáza) a IN (integráza). Gény pre ostatné regulačné proteíny (*Vif*, *Vpr*, *Vpu*, *Nef*, *Tat* a *Rev*) sa nachádzajú v odlišných ORF (Frankel* et al., 1998). Genóm HIV ďalej obsahuje LTR (dlhé terminálne opakujúce sa sekvencie) lemujúce kódujúcu sekvenciu (Sanchez-Pescador et al., 1985). Tie sú dôležitým prvkom HIV genómu z hľadiska regulácie transkripcie, nakoľko sa tu nachádza promótor, skrz ktorý môže byť posilnená génová expresia prostredníctvom bunkových či vírusových transkripčných faktorov (Gaynor*, 1992). V súvislosti s tematikou práce budú v nasledujúcich odstavcoch popísané iba tie proteíny, v ktorých prípade bolo preukázané, že dokážu modulovať redoxnú homeostázu bunky a tak eventuálne navodiť patologické stavy organizmu.



Obrázok 6- Schematický diagram HIV-1 genómu. Na genóme o celkovej dĺžke asi 9,7kb je graficky znázornená lokalizácia génov kódujúcich proteíny HIV-1. (↓) označuje potranslačné štiepenie polypeptidov *gag*, *pol* a *env*, z ktorých vznikajú uvedené funkčné proteínové produkty. Prevzaté a upravené podľa (Nkeze et al., 2015)

Protein *Tat* (transactivator of transcription) predstavuje dôležitý regulačný protein HIV, ktorý je vo svojej funkčnej forme translokovaný do jadra (Ruben et al., 1992). Tu slúži ako transaktivátor génovej expzie, pričom táto funkcia je závislá na jeho väzbe do TAR (trans-acting response element) sekvencie v rámci LTR oblastí integrovaného HIV provírusu (Harrich et al., 1995). Ešte predtým ako sa však viaže do TAR, regrutuje P-TEFb komplex (positive transcription elongation factor, taktiež ozn. CDK9/Cyklin T), pričom dochádza k autofosforylácii tohto komplexu, čím je umožnená väzba do TAR (Garber et al., 2000). Aktivovaný komplex naďalej dokáže hyperfosforylovať C-terminálnu doménu RNA polymerázy II, čo zvyšuje jej procesivitu v elongačnej fáze transkripcie (Isel et al., 1999). V súvislosti s oxidatívnym stresom, ku ktorému dochádza počas infekcie HIV, je aktivovaný aj transkripčný faktor NF- κ B, ktorý slúži ako *cis* regulačný element nachádzajúci sa pred LTR HIV provírusu (Pyo et al., 2008). Pri aktivácii NF- κ B je tak posilnená transkripcia génov HIV, pričom *Tat* dokáže ďalej indukovať tvorbu ROS a propagovať tak aktiváciu NF- κ B (Toborek et al., 2002). Vzhľadom na skutočnosť, že pod vplyvom transkripčného faktora NF- κ B sú aj gény hostiteľského organizmu, bolo preukázané, že v súvislosti s indukciou produkcie ROS prostredníctvom proteínu *Tat*, dochádza aj ku zvýšenej expresii mediátorov zápalovej odpovede a adhezívnych molekúl v monocytoch, a to vrátane VCAM-1 (adhézny proteín vaskulárnych buniek 1), ICAM-1 (intracelulárna adhezívna molekula 1), MCP-1 (chemoatraktantný proteín monocytov 1) a TNF- α , výsledkom čoho dochádza k invázii postihnutých monocytov do mozgu (Pu et al., 2003). Táto vlastnosť *Tat* je označovaná ako hlavný neurotoxický činiteľ HIV, v dôsledku ktorého dochádza k poškodzovaniu centrálnej nervovej sústavy (Buscemi et al., 2007).

Obalový proteín gp120 predstavuje ďalší patogénny faktor HIV, ktorý súvisí s narúšaním redoxnej homeostázy, výsledkom ktorej dochádza k oxidatívne mu poškodeniu a apoptóze hostiteľských buniek. Apoptóza nervových buniek je sprostredkovaná signalizačnou funkciou ROS, výsledkom ktorej dochádza v infikovaných bunkách k nárastu koncentrácie Ca^{2+} . V prípade, že v týchto bunkách došlo k indukcii tvorby GPx1 a SOD1 k apoptóze nedošlo. (Agrawal et al., 2010). Mimo tohto patogenického efektu je Gp120 esenciálny faktor virulencie HIV, nakoľko sa jedná o jednu z kľúčových zložiek sprostredkujúcich vstup viriónu do bunky. Táto skutočnosť je daná schopnosťou interakcie V3 slučky, v štruktúre gp120, s chemokínovými receptormi CCR5 (Tamamis et al., 2014) a CXCR4 (Tamamis et al., 2013). Bolo taktiež demonštrované, že v dôsledku indukcie oxidatívneho stresu týmto membránovým glykoproteínom, dochádza k aktivácii transkripčného faktora Nrf2 ako adaptívna odpoveď na vyvolanú oxidatívnu záťaž (Reddy et al., 2012).

5. Záver

V práci boli opísané najmä endogénne zdroje reaktívnych zlúčenín kyslíka, ktoré v bunkách vznikajú prostredníctvom enzýmov figurujúcich v imunitných odpovediach alebo neúčelovo v dôsledku aeróbného metabolizmu, ktorý je vírusovými ochoreniami často ovplyvnený. Boli popísané antioxidantné systémy odbúravajúce tieto potenciálne nebezpečné zlúčeniny, na základe čoho bola demonštrovaná ich esenciálna úloha v procese udržiavania redoxnej homeostázy buniek, na ktorej závisí ich integrita. Navyše boli opísané mechanizmy akými dokážu RONS poškodzovať základné stavebné a funkčné zložky buniek, vrátane lipidov, proteínov a nukleových kyselín, a okolnosti, za ktorých k takémuto poškodeniu môže dôjsť.

Naopak bolo ukázané, že za určitých podmienok, v nízkej koncentrácii, predstavujú RONS dôležité mediátory signálnych kaskád v rámci redoxnej signalizácie. Ako ukážkový prípad bola demonštrovaná pozitívna regulácia génov pre antioxidantné enzýmy prostredníctvom Nrf2, ktoré bunky využívajú ako prostriedok adaptívnej odpovede na oxidatívny stres pri narušení redoxnej homeostázy. RONS sa teda ukázali ako molekuly s duálnou povahou, ktorá je závislá od biologického kontextu indukcie ich tvorby.

Indukcia tvorby RONS bola viackrát pozorovaná v súvislosti s niektorými vírusovými infekciami, počas ktorých často dochádza k výraznému poklesu hladín GSH, čo indikuje narušenie redoxného stavu bunky v prospech oxidatívneho prostredia. Negatívny vplyv vírusových infekcií na redoxnú homeostázu buniek bol viacerými výskumnými tímami opísaný ako jeden zo základných patogénnych faktorov, ktorými disponujú. V práci boli ďalej uvedené vybrané mechanizmy, prostredníctvom ktorých niektoré vírusy a ich génové produkty narúšajú redoxnú homeostázu buniek.

Na základe týchto skutočností sa mnohé štúdie zamerali na výskum efektu redoxne aktívnych zlúčenín, pričom sa zistilo, že antioxidantné látky majú inhibičný vplyv na rozvoj infekcie. V súvislosti s tým bolo navrhnuté, že tieto látky môžu predstavovať nový spôsob liečby patológií vyvolaných vírusovými infekciami.

Vo výsledku je teda možné konštatovať, že redoxný stav, ktorý je regulovaný na viacerých úrovniach, je životne dôležitá charakteristika bunky. V prípade, že dôjde k narušeniu redoxnej homeostázy nastáva oxidatívny stres, ktorý je príčinou širokého spektra patológií vznikajúcich v súvislosti s vírusovými ochoreniami, ale nielen s nimi.

6. Zoznam použitej literatúry

- Agrawal, L., Louboutin, J.-P., Marusich, E., Reyes, B.A.S., Van Bockstaele, E.J., and Strayer, D.S. (2010). Dopaminergic neurotoxicity of HIV-1 gp120: Reactive oxygen species as signaling intermediates. *Brain Res.* 1306, 116–130.
- Akaike, T., Ando, M., Oda, T., Doi, T., Ijiri, S., Araki, S., and Maeda, H. (1990). Dependence on O₂ Generation by Xanthine Oxidase of Pathogenesis of Influenza Virus Infection in Mice. *J. Clin. Invest.* 85, 739–745.
- Akaike, T., Noguchi, Y., Ijiri, S., Setoguchi, K., Sugat, M., Mu Zhenget, Y., Dietzscholdt, B., and Maeda, H. (1996). Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: Involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 2448–2453.
- Alshykhly, O.R., Fleming, A.M., and Burrows, C.J. (2015). 5-Carboxamido-5-formamido-2-iminohydantoin, in Addition to 8-oxo-7,8-Dihydroguanine, Is the Major Product of the Iron-Fenton or X-ray Radiation-Induced Oxidation of Guanine under Aerobic Reducing Conditions in Nucleoside and DNA Contexts. *J. Org. Chem.* 80, 6996–7007.
- Amatore, D., Sgarbanti, R., Aquilano, K., Baldelli, S., Limongi, D., Civitelli, L., Nencioni, L., Garaci, E., Ciriolo, M.R., and Palamara, A.T. (2015). Influenza virus replication in lung epithelial cells depends on redox-sensitive pathways activated by NOX4-derived ROS. *Cell. Microbiol.* 17, 131–145.
- Bao, X., Sinha, M., Liu, T., Hong, C., Luxon, B.A., Garofalo, R.P., and Casola, A. (2008). Identification of human metapneumovirus-induced gene networks in airway epithelial cells by microarray analysis. *Virology* 374, 114–127.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.
- Bedard*, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313.
- Beg, A.A., Finco, T.S., Nantermet, P. V, and Baldwin, A.S. (1993). Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3301–3310.
- Berlett*, B.S., and Stadtman, E.R. (1997). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316.
- Biagioli, M.C., Kaul, P., Singh, I., and Turner, R.B. (1999). The role of oxidative stress in rhinovirus induced elaboration of IL-8 by respiratory epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 454–462.
- Birben*, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19.
- Blight, K.J. (2011). Charged Residues in Hepatitis C Virus NS4B Are Critical for Multiple NS4B Functions in RNA Replication. *J. Virol.* 85, 8158–8171.

- Botta, D., White, C.C., Vliet-Gregg, P., Mohar, I., Shi, S., McGrath, M.B., McConnachie, L.A., and Kavanagh, T.J. (2008). Modulating GSH Synthesis Using Glutamate Cysteine Ligase Transgenic and Gene-Targeted Mice. *Drug Metab. Rev.* *40*, 465–477.
- Boukhenouna, S., Mazon, H., Branlant, G., Jacob, C., Toledano, M.B., and Rahuel-Clermont, S. (2015). Evidence that glutathione and the glutathione system efficiently recycle 1-cys sulfiredoxin in vivo. *Antioxid. Redox Signal.* *22*, 731–743.
- Burrows*, C.J. (2009). Surviving an Oxygen Atmosphere: DNA Damage and Repair. In ACS Symposium Series EBooks, pp. 147–156.
- Buscemi, L., Ramonet, D., and Geiger, J.D. (2007). Human immunodeficiency virus type-1 protein Tat induces tumor necrosis factor- α -mediated neurotoxicity. *Neurobiol. Dis.* *26*, 661–670.
- Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C.I., and Stoppani, A.O.M. (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* *180*, 248–257.
- Camargo, C.A., Ginde, A.A., Clark, S., Cartwright, C.P., Falsey, A.R., and Niewoehner, D.E. (2008). Viral pathogens in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Intern. Emerg. Med.* *3*, 355–359.
- Camini, F.C., da Silva Caetano, C.C., Almeida, L.T., and de Brito Magalhães, C.L. (2017). Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. *Arch. Virol.* *162*, 907–917.
- Case, R.D., Piccionesi, E., Wolf, G., Benett, A.M., Lechleider, R.J., Neel, B.G., and Shoelons, S.E. (1994). SH-PTP2By SH2 Domain Binding Specificity Is Defined by Direct Interactions with Platelet-derived Growth Factor P-Receptor, Epidermal Growth Factor Receptor, and Insulin Receptor Substrate-1-derived Phosphopeptides. *J. Biol. Chem.* *269*, 10467–10474.
- Chae, H.Z., Kang, S.W., and Rhee, S.G. (1999). Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol.* *300*, 219–226.
- Chan, L.-P., Liu, C., Chiang, F.-Y., Wang, L.-F., Lee, K.-W., Chen, W.-T., Kuo, P.-L., and Liang, C.-H. (2017). IL-8 promotes inflammatory mediators and stimulates activation of p38 MAPK/ERK-NF- κ B pathway and reduction of JNK in HNSCC. *Oncotarget* *8*, 56375–56388.
- Chen, D., Hurst, W.J., Ding, J.M., Faiman, L.E., Mayer, B., and Gillette, M.U. (1997). Localization and Characterization of Nitric Oxide Synthase in the Rat Suprachiasmatic Nucleus: Evidence for a Nitroergic Plexus in the Biological Clock. *J. Neurochem.* *68*, 855–861.
- Choi, A.M.K., and Jacoby, D.B. (1992). Influenza virus A infection induces interleukin-8 gene expression in human airway epithelial cells. *FEBS Lett.* *309*, 327–329.
- Clark, R.A., Volpp, B.D., Leidal, K.G., and Nauseef, W.M. (1990). Two Cytosolic Components of the Human Neutrophil Respiratory Burst Oxidase Translocate to the Plasma Membrane during Cell Activation neutrophil NADPH oxidase-respiratory burst superoxide chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* *85*, 714-724
- Colell, A., García-Ruiz, C., Miranda, M., Ardite, E., Mari, M., Morales, A., Corrales, F., Kaplowitz, N., and Fernández-Checa, J.C. (1998). Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology* *115*, 1541–1551.
- Crapo, J.D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J.W., and Chang, L.-Y. (1992). Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 10405–10409.

- DeLeo, F.R., Allen, L.-A.H., Apicella, M., and Nauseef, W.M. (1999). During Phagocytosis NADPH Oxidase Activation and Assembly. *J. Immunol.* *163*, 6732–6740.
- Devasagayam, T.P.A., Steenken, S., Obendorf, M.S.W., Schulz, W.A., and Sies, H. (1991). Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry* *30*, 6283–6289.
- Didonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S., and Karin, M. (1996). Mapping of the Inducible IB Phosphorylation Sites That Signal Its Ubiquitination and Degradation. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 1295-1304
- Dong, X.-Y., Liu, W.-J., Zhao, M.-Q., Wang, J.-Y., Pei, J.-J., Luo, Y.-W., Ju, C.-M., and Chen, J.-D. (2013). Classical swine fever virus triggers RIG-I and MDA5-dependent signaling pathway to IRF-3 and NF- κ B activation to promote secretion of interferon and inflammatory cytokines in porcine alveolar macrophages. *Virol. J.* *10*, 286.
- Douglass, J.A., Dhimi, D., Gurr, C.E., Bulpitt, M., Shute, J.K., Howarth, P.H., Lindley, I.J., Church, M.K., and Holgate, S.T. (1994). Influence of interleukin-8 challenge in the nasal mucosa in atopic and nonatopic subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *150*, 1108–1113.
- Dupuy, C., Kaniewsky, J., Deme, D., Pommier, J., and Virion, A. (1989). NADPH-dependent H₂O₂ generation catalyzed by thyroid plasma membranes. Studies with electron scavengers. *Eur. J. Biochem.* *185*, 597–603.
- Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noël-Hudson, M.S., Dème, D., and Virion, A. (1999). Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J. Biol. Chem.* *274*, 37265–37269.
- Elazar, M., Cheong, K.H., Liu, P., Greenberg, H.B., Rice, C.M., and Glenn, J.S. (2003). Amphipathic Helix-Dependent Localization of NS5A Mediates Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Virol.* *77*, 6055–6061.
- Elmore*, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* *35*, 495–516.
- Etherington, C., Naseer, R., Conway, S.P., Whitaker, P., Denton, M., and Peckham, D.G. (2014). The role of respiratory viruses in adult patients with cystic fibrosis receiving intravenous antibiotics for a pulmonary exacerbation. *J. Cyst. Fibros.* *13*, 49–55.
- Fang, R., Jiang, Q., Zhou, X., Wang, C., Guan, Y., Tao, J., Xi, J., Feng, J.-M., and Jiang, Z. (2017). MAVS activates TBK1 and IKK ϵ through TRAFs in NEMO dependent and independent manner. *PLoS Pathog.* *13*, e1006720.
- Fink, K., Duval, A., Martel, A., Soucy-Faulkner, A., and Grandvaux, N. (2008). Dual Role of NOX2 in Respiratory Syncytial Virus- and Sendai Virus-Induced Activation of NF- κ B in Airway Epithelial Cells. *J. Immunol.* *180*, 6911–6922.
- Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.-M., and Maniatis, T. (2003). IKK ϵ and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* *4*, 491–496.
- Fouad, D. (2015). Molecular Modeling and Phylogeny of the Manganese Superoxide Dismutase from the Camel, *Camelus dromedarius*. *Pak. J. Zool.* *47*, 1015–1023.
- Frankel*, A.D., and Young, J.A.T. (1998). HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 1–25.

- Garaci, E., Palamara, A.T., Ciriolo, M.R., D'Agostini, C., del-Latif, M.S.A., Aquaro, S., Lafavia E., and Rotilio G. (1997). Intracellular GSH content and HIV replication in human macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *62*, 54–59.
- Garber, M.E., Mayall, T.P., Suess, E.M., Meisenhelder, J., Thompson, N.E., and Jones, K.A. (2000). CDK9 Autophosphorylation Regulates High-Affinity Binding of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat-P-TEFb Complex to TAR RNA. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 6958–6969.
- García-Mediavilla, M.V., Sánchez-Campos, S., González-Pérez, P., Gómez-Gonzalo, M., Majano, P.L., López-Cabrera, M., Clemente, G., García-Monzón, C., and González-Gallego, J. (2005). Differential contribution of hepatitis C virus NS5A and core proteins to the induction of oxidative and nitrosative stress in human hepatocyte-derived cells. *J. Hepatol.* *43*, 606–613.
- Gaudernak, E., Seipelt, J., Triendl, A., Grassauer, A., and Kuechler, E. (2002). Antiviral Effects of Pyrrolidine Dithiocarbamate on Human Rhinoviruses. *J. Virol.* *76*, 6004–6015.
- Gaynor*, R. (1992). Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS* *6*, 347–363.
- Gebicki, S., and Gebicki, J.M. (1993). Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem. J.* *289*, 743–749.
- Gebicki, S., and Gebicki, J.M. (1999). Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides. *Biochem. J.* *338*, 629–636.
- Geiszt, M., Kopp, J.B., Várnai, P., and Leto, T.L. (2000). Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 8010–8014.
- Geiszt, M., Lekstrom, K., Brenner, S., Hewitt, S.M., Dana, R., Malech, H.L., and Leto, T.L. (2003a). NAD(P)H Oxidase 1, a Product of Differentiated Colon Epithelial Cells, Can Partially Replace Glycoprotein 91phox in the Regulated Production of Superoxide by Phagocytes. *J. Immunol.* *171*, 299–306.
- Geiszt, M., Witt, J., Baffi, J., Lekstrom, K., and Leto, T.L. (2003b). Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J.* *17*, 1502–1504.
- Giles*, G., and Claus, J. (2002). Reactive Sulfur Species: An Emerging Concept in Oxidative Stress. *Biol. Chem.* *383*, 375–388.
- Gong, G., Waris, G., Tanveer, R., and Siddiqui, A. (2001). Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 9599–9604.
- Grune, T., Reinheckel, T., and Davies, K.J.A. (1996). Degradation of Oxidized Proteins in K562 Human Hematopoietic Cells by Proteasome*. *J. Biol. Chem.* *271*, 15504–15509.
- Guo, C., McDowell, I.C., Nodzenski, M., Scholtens, D.M., Allen, A.S., Lowe, W.L., and Reddy, T.E. (2017). Transversions have larger regulatory effects than transitions. *BMC Genomics* *18*, 394.
- Harrich, D., Mavankal, G., Mette-Snyder, A., and Gaynor, R.B. (1995). Human Immunodeficiency Virus Type 1 TAR Element Revertant Viruses Define RNA Structures Required for Efficient Viral Gene Expression and Replication. *J. Virol.* *69*, 4906–4913.
- Harrison, J.E., and Schultz, J. (1976). Studies on the Chlorinating Activity of Myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* *251*, 1–71.

- Hartmut, K., and Ullrich, V. (1982). Oxidase and Oxygenase Function of the Microsomal Cytochrome P450 Monooxygenase System. *Eur. J. Biochem.* *126*, 583–588.
- He*, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., and Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis. *Cell Physiol Biochem* *44*, 532–553.
- Hevel, J.M., White, K.A., and Marlettas, M.A. (1991). Purification of the Inducible Murine Macrophage Nitric Oxide Synthase. *J. Biol. Chem.* *266*, 22789–22791.
- Hoffmann, A., Leung, T.H., and Baltimore, D. (2003). Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *EMBO J.* *22*, 5530–5539.
- Hoffmann, C., Dietrich, M., Herrmann, A.-K., Schacht, T., Albrecht, P., and Methner, A. (2017). Dimethyl Fumarate Induces Glutathione Recycling by Upregulation of Glutathione Reductase. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2017*, 6093903.
- Holmgren, A. (1977). Bovine Thioredoxin System. *J. Biol. Chem* *252*, 4600–4606.
- Hong, Y., Yan, W., Chen, S., Sun, C., and Zhang, J. (2010). The role of Nrf2 signaling in the regulation of antioxidants and detoxifying enzymes after traumatic brain injury in rats and mice. *Acta Pharmacol. Sin.* *31*, 1421–1430.
- Isel, C., and Karn, J. (1999). Direct evidence that HIV-1 tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J. Mol. Biol.* *290*, 929–941.
- Isogai, Y., Shiro, Y., Nasuda-Kouyama, A., and Iizuka, T. (1991). Superoxide Production by Cytochrome b558 Purified from Neutrophils in a Reconstituted System with an Exogenous Reductase. *J. Biol. Chem.* *266*, 13481–13484.
- Israël, N., and Gougerot-Pocidallo, M.-A. (1997). Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection. *Cell. Mol. Life Sci. C.* *53*, 864–870.
- 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.
- Ivanov, A. V., Smirnova, O.A., Ivanova, O.N., Masalova, O. V., Kochetkov, S.N., and Isaguliants, M.G. (2011). Hepatitis C Virus Proteins Activate NRF2/ARE Pathway by Distinct ROS-Dependent and Independent Mechanisms in HUH7 Cells. *PLoS One* *6*, e24957; 1–11.
- Janowiak, B.E., and Griffith, O.W. (2005). Glutathione synthesis in *Streptococcus agalactiae*. One protein accounts for gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase activities. *J. Biol. Chem.* *280*, 11829–11839.
- Jiang, Z., Ninomiya-Tsuji, J., Qian, Y., Matsumoto, K., and Li, X. (2002). Interleukin-1 (IL-1) Receptor-Associated Kinase-Dependent IL-1-Induced Signaling Complexes Phosphorylate TAK1 and TAB2 at the Plasma Membrane and Activate TAK1 in the Cytosol. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7158–7167.
- Jones*, D.P. (2006). Redefining Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* *8*, 1865–1879.
- Kamata, H., Manabe, T., Oka, S., Kamata, K., and Hirata, H. (2002). Hydrogen peroxide activates IκB kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. *FEBS Lett.* *519*, 231–237.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* *6*, 981–988.

- Kawamata, H., and Manfredi, G. (2008). Different regulation of wild-type and mutant Cu,Zn superoxide dismutase localization in mammalian mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 3303–3317.
- Keyer, K., and Imlay, J.A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 13635–13640.
- Khomich*, O.A., Kochetkov, S.N., Bartosch, B., and Ivanov, A. V (2018). Redox Biology of Respiratory Viral Infections. *Viruses* *10*, 392.
- Kim, H.J., Kim, C.-H., Kim, M.-J., Ryu, J.-H., Seong, S.Y., Kim, S., Lim, S.J., Holtzman, M.J., and Yoon, J.-H. (2015). The Induction of Pattern-Recognition Receptor Expression against Influenza A Virus through Duox2-Derived Reactive Oxygen Species in Nasal Mucosa. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *53*, 525–535.
- Knaus, U.G., Heyworth, P.G., Kinsella, B.T., Curnutte, J.T., and Bokoch, G.M. (1992). Purification and Characterization of Rac. *267*, 23575–23582.
- 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.
- Koepke, J.I., Nakrieko, K.-A., Wood, C.S., Boucher, K.K., Terlecky, L.J., Walton, P.A., and Terlecky, S.R. (2007). Restoration of Peroxisomal Catalase Import in a Model of Human Cellular Aging. *Traffic* *8*, 1590–1600.
- Korenaga, M., Wang, T., Li, Y., Showalter, L.A., Chan, T., Sun, J., and Weinman, S.A. (2005). Hepatitis C Virus Core Protein Inhibits Mitochondrial Electron Transport and Increases Reactive Oxygen Species (ROS) Production. *J. Biol. Chem.* *280*, 37481–37488.
- Koshkin, V., Lotan, O., and Pick, E. (1997). Electron transfer in the superoxide-generating NADPH oxidase complex reconstituted in vitro. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)- Bioenerg.* *1319*, 139–146.
- Kozekov, I.D., Nechev, L. V., Moseley, M.S., Harris, C.M., Rizzo, C.J., Stone, M.P., and Harris, T.M. (2003). DNA Interchain Cross-Links Formed by Acrolein and Crotonaldehyde. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 50–61.
- Kukreja, R.C., Okabe, E., Schrier, G.M., and Hess, M.L. (1988). Oxygen radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of Ca²⁺-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* *261*, 447–457.
- Kundu, T.K., Velayutham, M., and Zweier, J.L. (2012). Aldehyde Oxidase Functions as a Superoxide Generating NADH Oxidase: An Important Redox Regulated Pathway of Cellular Oxygen Radical Formation. *Biochemistry* *51*, 2930.
- Kunsch, C., Ruben, S.M., and Rosen, C.A. (1992). Selection of Optimal KB/Rel DNA-Binding Motifs: Interaction of Both Subunits of NF- κ B with DNA Is Required for Transcriptional Activation. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 4412–4421.
- Lambeth*, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 181–189.
- Laurent-Crawford, A.G., Krust, B., Muller, S., Rivière, Y., Rey-Cuillé, M.-A., Béchet, J.-M., Montagnier, L., and Hovanessian, A.G. (1991). The cytopathic effect of hiv is associated with apoptosis. *Virology* *185*, 829–839.

- Lee, K.-W., Lee, Y., Kim, D.-S., and Kwon, H.-J. (2006). Direct role of NF- κ B activation in Toll-like receptor-triggered HLA-DRA expression. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1254–1266.
- Leyens, G., Donnay, I., and Knoops, B. (2003). Cloning of bovine peroxiredoxins—gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse and primate peroxiredoxins. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* *136*, 943–955.
- Li, S., Ye, L., Yu, X., Xu, B., Li, K., Zhu, X., Liu, H., Wu, X., and Kong, L. (2009). Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF- κ B activation. *Virology* *391*, 257–264.
- Li, Y., Boehning, D.F., Qian, T., Popov, V.L., and Weinman, S.A. (2007). Hepatitis C virus core protein increases mitochondrial ROS production by stimulation of Ca²⁺ uniporter activity. *FASEB J.* *21*, 2474–2485.
- Lo, Y.Y.C., Wong, J.M.S., and Cruz, T.F. (1996). Reactive Oxygen Species Mediate Cytokine Activation of c-Jun NH 2-terminal Kinases*. *J. Biol. Chem* *271*, 15703–15707.
- Longo, V.D., Gralla, E.B., and Valentine, J.S. (1996). Superoxide Dismutase Activity Is Essential for Stationary Phase Survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *271*, 12275–12280.
- Di Luzio, N.R. (1966). A mechanism of the acute ethanol-induced fatty liver and the modification of liver injury by antioxidants. *Am. J. Pharm. Sci. Support. Public Health* *15*, 50–63.
- Ma*, Q. (2013). Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *53*, 401–426.
- Mahmood, S., Kawanaka, M., Kamei, A., Izumi, A., Nakata, K., Niiyama, G., Ikeda, H., Hanano, S., Suehiro, M., Togawa, K., et al. (2004). Immunohistochemical Evaluation of Oxidative Stress Markers in Chronic Hepatitis C. *Antioxid. Redox Signal.* *6*, 19–24.
- Marklund, S.L., Holme, E., and Hellner, L. (1982). Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin. Chim. Acta* *126*, 41–51.
- Mastrorarde, J.G., Monick, M.M., and Hunninghake, G.W. (1995). Oxidant tone regulates IL-8 production in epithelium infected with respiratory syncytial virus. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *13*, 237–244.
- McCord, J.M., and Day, E.D. (1978). Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett.* *86*, 139–142.
- Meo*, S. Di, Reed, T.T., Venditti, P., and Victor, V.M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2016*, 1–44.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* *437*, 1167–1172.
- Mihaylova, V.T., Kong, Y., Fedorova, O., Pyle, A.M., Iwasaki, A., Foxman Correspondence, E.F., Sharma, L., Dela Cruz, C.S., and Foxman, E.F. (2018). Regional Differences in Airway Epithelial Cells Reveal Tradeoff between Defense against Oxidative Stress and Defense against Rhinovirus. *Cell Rep.* *24*, 3000–3007.
- Mittler*, R. (2017). ROS Are Good. *Trends Plant Sci.* *22*, 11–19.

- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., and Kan, Y.W. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *91*, 9926–9930.
- Monteiro, G., Horta, B.B., Pimenta, D.C., Augusto, O., and Netto, L.E.S. (2007). Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4886–4891.
- Moore, T.C., Cody, L., Kumm, P.M., Brown, D.M., and Petro, T.M. (2013). IRF3 helps control acute TMEV infection through IL-6 expression but contributes to acute hippocampus damage following TMEV infection. *Virus Res.* *178*, 226–233.
- Moreno-Solís, G., dela Torre-Aguilar, M.J., Torres-Borrego, J., Llorente-Cantarero, F.J., Fernández-Gutiérrez, F., Gil-Campos, M., Túnez-Fiñana, I., and Pérez-Navero, J.L. (2017). Oxidative stress and inflammatory plasma biomarkers in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin. Respir. J.* *11*, 839–846.
- Moreno, J.C., Bikker, H., Kempers, M.J.E., van Trotsenburg, A.S.P., Baas, F., de Vijlder, J.J.M., Vulsma, T., and Ris-Stalpers, C. (2002). Inactivating Mutations in the Gene for Thyroid Oxidase 2 (THOX2) and Congenital Hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.* *347*, 95–102.
- Na*, H.-K., and Surth, Y.-J. (2007). Transcriptional Regulation via Cysteine Thiol Modification: A Novel Molecular Strategy for Chemoprevention and Cytoprotection. *Mol. Carcinog.* *329*, 315–329.
- Nichols*, W.G., Peck Campbell, A.J., and Boeckh, M. (2008). Respiratory Viruses Other than Influenza Virus: Impact and Therapeutic Advances. *Clin. Microbiol. Rev.* *21*, 274–290.
- Nicholson, K.G., Kent, J., and Ireland, D.C. (1993). Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* *307*, 982–986.
- Niedernhofer, L.J., Daniels, J.S., Rouzer, C.A., Greene, R.E., Marnett, L.J., and Hancock, B. (2003). Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 31426–31433.
- Nin, N., Sánchez-Rodríguez, C., Ver, L.S., Cardinal, P., Ferruelo, A., Soto, L., Deicas, A., Campos, N., Rocha, O., Ceraso, D.H., et al. (2012). Lung histopathological findings in fatal pandemic influenza A (H1N1). *Med. Intensiva* *36*, 24–31.
- Nishi, T., Shimizu, N., Hiramoto, M., Sato, I., Yamaguchi, Y., Hasegawa, M., Aizawa, S., Tanaka, H., Kataoka, K., Watanabe, H., et al. (2002). Spatial Redox Regulation of a Critical Cysteine Residue of NF- κ B in Vivo. *J. Biol. Chem.* *277*, 44548–44556.
- Nishikimi, M. (1975). Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *63*, 463–468.
- Nishimura, J.S., Dodd, E.A., and Meister, A. (1964). Intermediate Formation of Dipeptide-Phosphate Anhydride in Enzymatic Tripeptide Synthesis. *J. Biol. Chem.* *229*, 2553–2558.
- Nkeze, J., Li, L., Benko, Z., Li, G., and Zhao, R.Y. (2015). Molecular characterization of HIV-1 genome in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Biosci.* *5*, 47.
- Nolan, G.P., Ghosh, S., Liou, H.-C., Tempst, P., and Baltimore, D. (1991). DNA binding and I κ B inhibition of the cloned p65 subunit of NF- κ B, a rel-related polypeptide. *Cell* *64*, 961–969.
- Nunoshiba, T., Obata, F., Boss, A.C., Oikawa, S., Mori, T., Kawanishi, S., and Yamamoto, K. (1999). Role of Iron and Superoxide for Generation of Hydroxyl Radical, Oxidative DNA Lesions, and Mutagenesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *274*, 34832–34837.

- Papiris, S.A., Tomos, I.P., Karakatsani, A., Spathis, A., Korbila, I., Analitis, A., Kolilekas, L., Kagouridis, K., Loukides, S., Karakitsos, P., et al. (2018). High levels of IL-6 and IL-8 characterize early-on idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbations. *Cytokine* *102*, 168–172.
- Peshenko, I. V., and Shichi, H. (2001). Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* *31*, 292–303.
- Peskin, A. V., Pace, P.E., Behring, J.B., Paton, L.N., Soethoudt, M., Bachschmid, M.M., and Winterbourn, C.C. (2015). Glutathionylation of the Active Site Cysteines of Peroxiredoxin 2 and Recycling by Glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* *291*, 3053–3062.
- Peterhans, E. (1979). Sendai virus stimulates chemiluminescence in mouse spleen cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *91*, 383–392.
- Peterhans, E. (1980). Chemiluminescence: An early event in the interaction of sendai and influenza viruses with mouse spleen cells I. The role of the envelope gP. Peterhans, E. (1980). Chemiluminescence: An early event in the interaction of sendai and influenza viruses with mouse. *Virology* *105*, 445–455.
- Peterhans, E., Grob, M., Burge, T., and Zanoni, R. (1987). Virus-Induced Formation of Reactive Oxygen Intermediates in Phagocytic Cells. *Free Radic. Res. Commun.* *3*, 39–46.
- Petruzzello, A., Marigliano, S., Loquercio, G., Cozzolino, A., and Cacciapuoti, C. (2016). Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J. Gastroenterol.* *22*, 7824.
- Phaniendra*, A., Jestadi, D.B., and Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* *30*, 11–26.
- Pizzinat, N., Copin, N., Vindis, C., Parini, A., and Cambon, C. (1999). Reactive oxygen species production by monoamine oxidases in intact cells. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* *359*, 428–431.
- Pu, H., Tian, J., Flora, G., Woo Lee, Y., Nath, A., Hennig, B., and Toborek, M. (2003). HIV-1 tat protein upregulates inflammatory mediators and induces monocyte invasion into the brain. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 224–237.
- Pyo, C.-W., Yang, Y.L., Yoo, N.-K., and Choi, S.-Y. (2008). Reactive oxygen species activate HIV long terminal repeat via post-translational control of NF- κ B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *376*, 180–185.
- Quinn, M.T., Mullen, M.L., Jesaitis, A.J., and Linner, J.G. (1992). Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b559. *Blood* *79*, 1563–1573.
- Ramos*, J.W. (2008). The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 2707–2719.
- Reddy, P.B., Gandhi, N., Samikkannu, T., Saiyed, Z., Agudelo, M., Yndart, A., Khatavkar, P., and Nair, M.P. (2012). HIV-1 gp120 induces antioxidant response element-mediated expression in primary astrocytes: Role in HIV associated neurocognitive disorder. *Neurochem. Int.* *61*, 807–814.
- Refsgaard, H.H.F., Tsai, L., and Stadtman, E.R. (2000). Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 611–616.

- Rigutto, S., Hoste, C., Grasberger, H., Milenkovic, M., Communi, D., Dumont, J.E., Corvilain, B., Miot, F., and De Deken, X. (2009). Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2: differential regulation mediated by camp-dependent protein kinase and protein kinase C-dependent phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *284*, 6725–6734.
- Samanta, M., Iwakiri, D., and Takada, K. (2008). Epstein–Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene* *27*, 4150–4160.
- Sanchez-Pescador, R., Power, M., Barr, P., Steimer, K., Stempien, M., Brown-Shimer, S., Gee, W., Renard, A., Randolph, A., Levy, J., et al. (1985). Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science* *227*, 484–492.
- Sato, M., Tanaka, N., Hata, N., Oda, E., and Taniguchi, T. (1998). Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN- β gene. *FEBS Lett.* *425*, 112–116.
- Schafer*, F.Q., and Buettner, G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* *30*, 1191–1212.
- Sena*, L.A., and Chandel, N.S. (2012). Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mol. Cell* *48*, 158–167.
- Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.-K., and Chen, Z.J. (2005). Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- κ B and IRF3. *Cell* *122*, 669–682.
- Shaul, P.W., North, A.J., Wu, L.C., Wells, L.B., Brannon, T.S., Lau, K.S., Michel, T., Margraf, L.R., and Star, R.A. (1994). Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J. Clin. Invest.* *94*, 2231–2236.
- Shin, D.-H., Martinez, S.S., Parsons, M., Jayaweera, D.T., Campa, A., and Baum, M.K. (2012). Relationship of Oxidative Stress with HIV Disease Progression in HIV/HCV Co-infected and HIV Mono-infected Adults in Miami. *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma.* *2*, 217–223.
- Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naitoi, S., Hattori, M., Sakaki, Y., and Sumimoto, H. (2001). A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J. Biol. Chem.* *276*, 1417–1423.
- Sies*, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* *11*, 613–619.
- Sies*, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Curr. Opin. Toxicol.* *7*, 122–126.
- Sies*, H., Berndt, C., and Jones, D.P. (2017). Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* *86*, 715–748.
- Sies, H. (1985). Oxidative Stress: Introductory Remarks. In *Oxidative Stress*. Academic Press, London, 1–8.
- Simmons, G., Reeves, J.D., McKnight, A., DeJucq, N., Hibbitts, S., Power, C.A., Aarons, E., Schols, D., De Clercq, E., Proudfoot, A.E., et al. (1998). CXCR4 as a functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages. *J. Virol.* *72*, 8453–8457.
- Slater, L., Bartlett, N.W., Haas, J.J., Zhu, J., Message, S.D., Walton, R.P., Sykes, A., Dahdaleh, S., Clarke, D.L., Belvisi, M.G., et al. (2010). Co-ordinated Role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the Innate Response to Rhinovirus in Bronchial Epithelium. *PLoS Pathog.* *6*, e1001178.

- Smirnova, O.A., Ivanova, O.N., Bartosch, B., Valuev-Elliston, V.T., Mukhtarov, F., Kochetkov, S.N., and Ivanov, A. V (2016). Hepatitis C Virus NS5A Protein Triggers Oxidative Stress by Inducing NADPH Oxidases 1 and 4 and Cytochrome P450 2E1. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–10.
- Snelgrove, R.J., Edwards, L., Rae, A.J., and Hussell, T. (2006). An absence of reactive oxygen species improves the resolution of lung influenza infection. *Eur. J. Immunol.* 36, 1364–1373.
- Soo Bae, Y., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B., and Rhee, S.G. (1997). Epidermal Growth Factor (EGF)-induced Generation of Hydrogen Peroxide. *J. Biol. Chem.* 272, 217–221.
- Soucy-Faulkner, A., Mukawera, E., Fink, K., Martel, A., and Jouan, L. (2010). Requirement of NOX2 and Reactive Oxygen Species for Efficient RIG-I-Mediated Antiviral Response through Regulation of MAVS Expression. *PLoS Pathog* 6, 1000930.
- Strengert, M., Jennings, R., Davanture, S., Hayes, P., Gabriel, G., and Knaus, U.G. (2014). Mucosal Reactive Oxygen Species Are Required for Antiviral Response: Role of Duox in Influenza A Virus Infection. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 2695–2709.
- Suliman, H.B., Ryan, L.K., Bishop, L., and Folz, R.J. (2001). Prevention of influenza-induced lung injury in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 280, 69–78.
- Sundaresan, M., Yu, Z.-X., Ferrans, V.J., Irani, K., and Finkel, T. (1995). Requirement for Generation of H₂O₂ for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction. *Science* 270, 296–299.
- Swindle, E.J., Coleman, J.W., DeLeo, F.R., and Metcalfe, D.D. (2007). Fc RI- and Fc Receptor-Mediated Production of Reactive Oxygen Species by Mast Cells Is Lipoxygenase- and Cyclooxygenase-Dependent and NADPH Oxidase-Independent. *J. Immunol.* 179, 7059–7071.
- Tamamis, P., and Floudas, C.A. (2013). Molecular recognition of CXCR4 by a dual tropic HIV-1 gp120 V3 loop. *Biophys. J.* 105, 1502–1514.
- Tamamis, P., and Floudas, C.A. (2014). Molecular Recognition of CCR5 by an HIV-1 gp120 V3 Loop. *PLoS One* 9, e95767.
- Tan, S., Sagara, Y., Liu, Y., Maher, P., and Schubert, D. (1998). The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J. Cell Biol.* 141, 1423–1432.
- Toborek, M., Lee, Y.W., Pu, H., Malecki, A., Flora, G., Garrido, R., Hennig, B., Bauer, H.-C., and Nath, A. (2002). HIV-Tat protein induces oxidative and inflammatory pathways in brain endothelium. *J. Neurochem.* 84, 169–179.
- Traenckner, Eb.-M., LPahl, H., Henkel, T., NSchmidt, K., Wilk, S., and ABaeuerle, P. (1995). Phosphorylation of human IKB-ox on serines 32 and 36 controls IKB-a proteolysis and NF-KB activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* 14, 2876–2883.
- Turrens, J.F., and Boveris, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* 191, 421–427.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Mastroeni, P., Ischiropoulos, H., and Fang, F.C. (2000). Antimicrobial Actions of the NADPH Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Experimental Salmonellosis. I. Effects on Microbial Killing by Activated Peritoneal Macrophages In Vitro. *J. Exp. Med.* 192, 227–236.

- Van Der Vliet, A., Smith, D., O'Neill, C.A., Kaur, H., Darley-Usmar, V., Cross, C.E., and Halliwell, B. (1994). Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem. J* 303, 295–301.
- Wagoner, J., Austin, M., Green, J., Imaizumi, T., Casola, A., Brasier, A., Khabar, K.S.A., Wakita, T., Gale, M., Polyak, S.J., et al. (2007). Regulation of CXCL-8 (interleukin-8) induction by double-stranded RNA signaling pathways during hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 81, 309–318.
- Wang, H., Liu, K., Geng, M., Gao, P., Wu, X., Hai, Y., Li, Y., Li, Y., Luo, L., Hayes, J.D., et al. (2013). RXR Inhibits the NRF2-ARE Signaling Pathway through a Direct Interaction with the Neh7 Domain of NRF2. *Cancer Res.* 73, 3097–3108.
- Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S., and Cao, Z. (1997). MyD88: An Adapter That Recruits IRAK to the IL-1 Receptor Complex. *Immunity* 7, 837–847.
- Wientjes, F.B., Hsuan, J.J., Totty, N.F., and Segal, A.W. (1993). p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain srchomology 3 domains. *Biochem. J.* 296, 557–561.
- Woo, H.A., Won Kang, S., Kim, H.K., Yang, K.-S., Chae, H.Z., and Rhee, S.G. (2003). Reversible Oxidation of the Active Site Cysteine of Peroxiredoxins to Cysteine Sulfinic Acid. *J. Biol. Chem.* 278, 47361–47364.
- Woo, H.A., Jeong, W., Chang, T.-S., Park, K.J., Park, S.J., Yang, J.S., and Rhee, S.G. (2004). Reduction of Cysteine Sulfinic Acid by Sulfiredoxin Is Specific to 2-Cys Peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* 280, 3125–3128.
- Xu, L.-G., Wang, Y.-Y., Han, K.-J., Li, L.-Y., Zhai, Z., and Shu, H.-B. (2005). VISA Is an Adapter Protein Required for Virus-Triggered IFN- β Signaling. *Mol. Cell* 19, 727–740.
- Xu, P., Bailey-Bucktrout, S., Xi, Y., Xu, D., Du, D., Zhang, Q., Xiang, W., Liu, J., Melton, A., Sheppard, D., et al. (2014). Innate Antiviral Host Defense Attenuates TGF- β Function through IRF3-Mediated Suppression of Smad Signaling. *Mol. Cell* 56, 723–737.
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J., and Israël, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93, 1231–1240.
- Yim, M.B., Chae, H.Z., Rhee, S.G., Chock, P.B., and Stadtman, E.R. (1994). On the Protective Mechanism of the Thiol-specific Antioxidant Enzyme against the Oxidative Damage of Biomacromolecules. *J. Biol. Chem.* 269, 1621–1626.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5, 730–737.
- Yu, L., Quinn, M.T., Cross, A.R., and Dinauer, M.C. (1998). Gp91 phox is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase.
- Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997). The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 91, 243–252.
- Zhang, J., and Bai, C. (2018). The Significance of Serum Interleukin-8 in Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Tanaffos* 17, 13–21.

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.