

УЧАСТИЕ ТИО-, ПЕРОКСИ- И ГЛУТАРЕДОКСИНОВ В КЛЕТОЧНЫХ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССАХ

© 2008 г. Е. В. КАЛИНИНА^{1,2}, Н. Н. ЧЕРНОВ³,
А. Н. САПРИН¹

¹Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии
РАН, Москва;

²НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва;

³Российский университет дружбы народов, Москва

I. Введение. II. Тиоредоксины. III. Тиоредоксинредуктазы.
IV. Пероксиредоксины. V. Глутаредоксины. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Редокс-зависимые процессы в значительной степени влияют на функциональную активность многих белков, участвуют в регуляции важнейших для жизнедеятельности клетки процессах, таких как пролиферация, дифференцировка, апоптоз. В последнее время особое внимание исследователей привлекает изучение тиол-дисульфидной регуляции, осуществляемой редокс-белками, активность которых обусловлена редокс-активным участком в виде аминокислотной

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ASK-1 – регулирующая апоптотические сигналы киназа 1; AP-1 – активаторный белок 1; ARE – антиоксидант-респонсивный элемент (antioxidant-responsive element); Cdc2 – циклин-зависимая киназа 2; ERK – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; Gtx – глутаредоксин; GSH, GSSG – глутатион восстановленный, окисленный; GST P1-1 – глутатионтрансфераза P1-1; iNOS – индуцибельная изоформа NO-синтазы; JNK – c-Jun-N-концевая киназа; MAPK – митогенаактивированная протеинкиназа; MEK – MAPK/ERK киназа; Mn-SOD – Mn-зависимая супероксиддисмутаза; NF-kB – ядерный фактор kB; IκB – ингибитор kB; Nrf2 – NF-E2-зависимый фактор 2; PKC – протеинкиназа C; PDI – протеиндисульфидизомераза; Prx – пероксиредоксин; SAPK – стресс активируемая протеинкиназа; SEK – SAPK/ERK киназа; Sec – селеноцистеин; Tx – тиоредоксин, Tx1 и Tx2 – его цитоплазматическая и митохондриальная изоформы, соответственно; TrxR – тиоредоксинредуктаза.

Адрес для корреспонденции: kevsan@orc.ru

последовательности с двумя или одним активными тиолами. Среди этих белков выделяются две тиолдисульфидредуктазы – тиоредоксин (Trx) и глутаредоксин (Grx), которые входят в состав суперсемейства тиоредоксинов. Эти ферменты полифункциональны и образуют тиоредоксин- и глутаредоксин-зависимые системы, играющие важную роль в поддержании внутриклеточного редокс-гомеостаза. Первая система содержит помимо тиоредоксина НАДФН-зависимую тиоредоксинредуктазу (TrxR), которая восстанавливает окисленную форму тиоредоксина. Вторая система включает глутатион (GSH) в качестве агента, восстанавливающего окисленный глутаредоксин, и глутатионредуктазу, восстанавливающую глутатион из его окисленной формы (GSSG).

Обе эти системы вносят существенный вклад в антиоксидантную защиту клеток от деструктивного воздействия окислительного стресса, вызывающего образование внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей в белках, окисление функциональных SH-групп с образованием сульфоновой кислоты и последующей протеасомальной деградацией белка [1, 2].

В антиоксидантной защите принимают участие пероксиредоксины, разлагающие H_2O_2 , органические гидроперекиси и пероксинитрит [3, 4]. Кофактором этих ферментов в большинстве случаев являются определенные изоформы тиоредоксина. Следует также отметить антиоксидантную активность тиоредоксинредуктазы 1 (TrxR1), которая обладает способностью напрямую восстанавливать многие субстраты, в том числе гидроперекиси липидов, H_2O_2 , дегидроаскорбиновую и липоевую кислоты [5–8].

Основное внимание в данном обзоре уделено рассмотрению функциональных свойств Trx и Grx, поддерживающих редокс-зависимое тиол-дисульфидное состояние белков, влияющее на их структуру и функции. Обсуждается механизм регуляции ряда важных для жизнедеятельности клетки процессов, включая регуляцию клеточного цикла, ингибирование апоптоза и регуляцию активности транскрипционных факторов.

II. ТИОРЕДОКСИНЫ

Тиоредоксин (КФ 1.8.4.8) – полифункциональный низкомолекулярный белок, имеющий в своей структуре активный дитиол/дисульфидный участок и обладающий оксидоредуктазной активностью. Впервые обнаруженный в *E. coli* Trx позднее найден во многих эукариотических и прокариотических клетках [9]. Основными изоформами Trx явля-

ются цитозольный Tgx1 и митохондриальный Tgx2. Кроме того, известны Tgx1-подобный белок (обозначенный как p32^{TgxL}), а также недавно обнаруженный Tgx2-подобный белок (Tgl2), который связан с системой микротрубочек цитоскелета [10]. В настоящее время семейство Tgx включает более 10 белков.

Tgx1 человека – низкомолекулярный белок (12 кДа), состоящий из 105 а. о. и локализованный в основном в цитоплазме, обнаружен также в клеточном ядре и плазме крови. Tgx2 синтезируется вначале в виде белка-предшественника (18 кДа), содержащего 166 аминокислот, включая N-концевую последовательность из 60 аминокислот, которая после удаления в ходе посттрансляционного протеолиза превращается в Tgx2 (12,2 кДа) и экспортируется в митохондрии. Белок p32^{TgxL} имеет высокую степень гомологии с Tgx1 и также локализован в цитоплазме, однако его функция не вполне ясна.

Установлено, что Tgx1 может претерпевать посттрансляционную модификацию: в результате частичного протеолиза он превращается в Tgx80, состоящий из 80 N-концевых а. о. Этот фермент секретируется из клетки и обладает цитокин-подобной активностью [11]. S-нитрозилирование по Cys69 важно для антиапоптотического действия Tgx1 [12], а его глутатионилирование по Cys73 может предотвращать димеризацию Tgx1, вызываемую окислительным стрессом [1].

Tgx1 и TgxR1 могут находиться как внутри клеток, так и во внеклеточном пространстве [13, 14]. Различные типы клеток, включая опухолевые, секретируют Tgx1 [15], причем, по-видимому, секреция не чувствительна к окислению [16]. Однако процесс секреции может изменяться в присутствии различных ксенобиотиков, включая алкилирующие агенты. Сравнительное изучение секреции на нормальных клетках печени и клетках HepG2 гепатокарциномы показало, что только нормальные клетки обладают высокой секрецией Tgx1 [17], секреция же Tgx1 клетками HepG2 усиливалась в присутствии 80 мкМ 2-меркаптоэтанола или 5 мМ N-ацетилцистеина. Однако позже эти клетки претерпевали морфологические изменения, сопровождающиеся ингибированием их роста. Экзогенный Tgx1 (100 нМ) ингибировал пролиферацию клеток HepG2, но не индуцировал секрецию эндогенного Tgx1.

До сих пор неясно может ли секретируемый Tgx1 обеспечивать защиту клеток (организма) от действия ксенобиотиков и окислительного стресса, хотя внеклеточный Tgx1 играет, по-видимому, определенную роль в развитии ответа на воспаление. Так, в плазме крови отмечалось повышение уровня Tgx1 при таких заболеваниях, как ВИЧ [18], ревматоидный артрит [19], астма [20], гепатит С [21].

Секретируемый Tx1 действует как хемотаксический фактор для нейтрофилов, моноцитов и Т-клеток [22], в то же время установлено его ингибирующее влияние на хемотаксис нейтрофилов, инициированный эндотоксином [18].

Tx1 может перемещаться в ядро под действием многих факторов. Это продемонстрировано с помощью вестерн блоттинга на клеточных культурах при действии H_2O_2 [27], гипоксии [28], форболовых эфиров [29, 30], фактора некроза опухоли [30], ультрафиолетовой [29, 31] и ионизирующей радиации [32], интерлейкина- 1β [33] и цисплатины [34], а также при ишемически-реперфузионном повреждении мозга [35].

Tx2 клонирован из кДНК библиотеки сердца крысы [23] и человека [24], клеток остеосаркомы и эмбриональных стволовых клеток человека [25]. Ген *TRX2* экспрессируется практически во всех органах и тканях, причем наиболее высокая его экспрессия обнаружена в мозгу [26]. Установлено также, что Tx2 локализован в митохондриях клеток. Причем уровень мРНК Tx2 соответствует уровню содержания белка Tx2 [25].

Следует отметить, что тиоредоксины эволюционировали подобно шаперон-подобным белкам, функция которых заключается в сохранении дитиол/дисульфидной структуры белков [36]. Высококонсервативная аминокислотная последовательность активного центра (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys) содержит 2 активных остатка Cys (Cys32 и Cys35 у Tx1 и Cys90 и Cys93 у Tx2 человека), которые окисляются в соответствующие дисульфиды в результате переноса двух восстановительных эквивалентов от Tx к дисульфидсодержащему субстрату (рис. 1). Образующиеся в активных центрах Tx1 и Tx2 дисульфиды восстанавливаются тиоредоксинредуктазой (НАДФН-зависимым селенофлавопротеином), которая имеет две основные изоформы: цитозольную (TxR1) и митохондриальную (TxR2).

В отличие от митохондриального Tx2 цитозольный Tx1 имеет три остатка Cys в дополнение к двум, локализованным в активном центре. Таким образом, существует еще один участок тиол-дисульфидного обмена, содержащий остатки Cys62 и Cys69 [37]. Интересно отметить способность Tx1 связываться с 15-диоксипростагландином по остаткам Cys35 и Cys69 [38]. Дополнительные остатки Cys в его молекуле (особенно Cys72, локализованный в петле рядом с активным центром) могут окисляться, что приводит к образованию димера с последующей потерей каталитической активности [39]. Более высокая резистентность к окислению у Tx2, очевидно, связана с отсутствием дополнительных остатков цистеина [24]. Разница в устойчивости к окислению может также объясняться более высоким

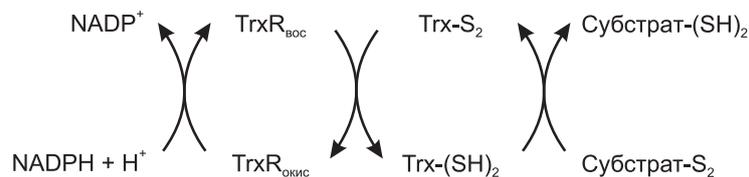


Рис. 1. Схема реакций, катализируемых тиоредоксин-зависимой системой (Tlx – тиоредоксин, TlxR – тиоредоксинредуктаза).

внутриклеточным уровнем Tlx2 в тканях, обладающих высокой метаболической активностью. Следует отметить, что p32^{TlxL} содержит аналогичный Tlx1 активный центр [40].

Холмгрен и Фагерстедт [41] предложили разделять дитиольные и дисульфидные формы бактериального Tlx путем получения производных йодуксусной кислоты и использования нативного гель-электрофореза. С помощью этого метода удалось установить, что в логарифмической фазе роста *E. coli* около 60% Tlx находится в восстановленном состоянии [41]. Фернандо с соавт. [42], используя дополнительно к этому антитела к Tlx1, разработали так называемый метод редокс-вестерн блоттинга для оценки редокс-состояния Tlx1. С помощью этого метода они установили, что в эндотелиальных клетках практически весь Tlx1 находится в восстановленной форме, причем не только в нормальных условиях, но даже и после воздействия H₂O₂ 70–85% Tlx1 остается в полностью восстановленном состоянии. Дас с соавт. [43], используя метод редокс-вестерн блоттинга для оценки редокс-статуса окисленного Tlx1 при его добавлении к клеткам аденокарциномы человека A549, обнаружили, что 45% поступившего в клетки Tlx1 находилось в полностью или частично восстановленном состоянии. При добавлении к культуральной среде TlxR1 и НАДФН этот показатель возрастал до 80% и выше.

Метод редокс-вестерн блоттинга в настоящее время применяется для определения стандартного редокс-потенциала (E₀) Tlx1, обычно равного –230 mV [37], и измерения редокс-состояния Tlx1 в цитоплазме [44, 45] и ядре [46]. Установлено, что 95% Tlx1 находится в восстановленном состоянии в обоих компартментах (редокс-потенциал (E_h) равен –280 mV).

Tlx1 обладает многими функциями: выполняет роль ростового фактора, кофактора ферментов (см. ниже), осуществляет регуляцию активности ряда транскрипционных факторов, способствует сохранению фолдинга белков. Помимо этого он участвует в развитии резистентности раковых клеток к противоопухолевым препаратам и обеспечивает защиту от окислительного стресса. Последнее наблю-

далось, в частности, в случае повреждения легких под действием блеомицина и индуцированной доксорубицином кардиотоксичности [47–51]. Механизмы протекторного действия Tgx1, по-видимому, в значительной степени связаны с его ролью в редокс-регуляции клеточного сигналинга в большей степени, чем с непосредственным участием в редокс-зависимых реакциях, так как обычно его содержание в клетке значительно меньше других эндогенных антиоксидантов, в частности GSH.

Обе изоформы тиоредоксина вносят заметный вклад в антиоксидантную защиту клеток, что определяется не только их способностью восстанавливать каталитическую активность пероксиредоксинов и глутатионпероксидаз, разлагающих гидроперекиси и H_2O_2 [52], но и способностью Tgx1 непосредственно восстанавливать H_2O_2 и GSSG [53]. Кроме того, обе изоформы могут играть роль «ловушки» $\bullet OH$ радикалов [54].

Известно, что Tgx1 служит кофактором ряда ферментов [55], таких, например, как пероксиредоксины [52], рибонуклеотидредуктазы и метионинсульфоксидредуктазы, участвует в репарации ДНК [9].

Большинство опухолевых клеток человека отличается повышенным уровнем Tgx1. По-видимому, Tgx1 является атипичным фактором роста, так как он не связывается с каким-либо специфическим рецептором. Скорее всего, его можно рассматривать не как фактор роста, а как важный ростовой кофактор. Механизмы, лежащие в основе проростовой активности Tgx1 могут осуществляться благодаря его способности предотвращать инактивацию или повышать активность других эндогенных ростовых факторов.

Многофункциональность Tgx дает основание считать его весьма важным для обеспечения жизнеспособности клеток. Такой вывод подтверждается данными об эмбриональной летальности на ранней стадии развития мышей, нокаутных как по гену *TXN1* [56], так и по гену *TXN2* [57]. Фибробласты эмбрионов, нокаутных по гену *TXN2*, подвергаются обширному апоптозу. Интересно отметить, что в данном случае появление летальности наблюдается в средней точке развития. Напротив, гибель мышей, нокаутных по гену *TXN1*, происходит вскоре после имплантации [56]. Авторы пришли к заключению, что повышение уровня АФК является главной причиной гибели мышей, нокаутных по гену *TXN2*, и, следовательно, Tgx2 является критическим компонентом антиоксидантной защитной системы. В целом, хотя основные редокс-зависимые реакции Tgx1 и Tgx2 весьма сходны и оба важны для эмбриогенеза, различия в стадиях эмбриональной гибели свидетельствуют о существовании различий в их функциях.

В настоящее время установлено несколько функций Tgx2. Изолированный из митохондрий мозга свиньи Tgx2 катализирует переход из окисленной в восстановленную форму нативной 4-аминобутиратаминотрансферазы [58] и рибонуклеотидредуктазы *E. coli* [59]. Исследования на дрожжах показали, что Tgx2 действует как восстановитель окисленной формы митохондриального перокси-редоксина 3 (Px3), восстанавливающего, в свою очередь, перекиси. Мутантные клетки дрожжей, дефицитные по Tgx2, более чувствительны к действию H₂O₂ [60]. Редди с соавт. установили, что в хрусталике глаза мыши Эмери, используемой в качестве модели для изучения образования старческой катаракты, наблюдалось повышение уровня мРНК и белка Tgx1 через три недели после фотохимического воздействия, а через 6 недель, напротив, зарегистрировано снижение уровня мРНК Tgx2. Предполагается, что неспособность поддерживать или повышать уровень Tgx2 является критической для развития такого рода патологии [61]. Кроме того, Tgx2, подобно Tgx1, может восстанавливать инсулин в присутствии НАДФН и TgxR2. Данная реакция используется для оценки общей активности изоформ тиоредоксина *in vitro* [62].

Показатели уровня Tgx1 в плазме или сыворотке крови могут быть использованы для диагностики ряда заболеваний [63]. Так, при сердечно-сосудистой патологии уровень Tgx1 в сыворотке крови значительно возрастает, причем не только при обострении ишемической болезни сердца [64, 65], но и при хронической сердечной недостаточности [66].

Оказалось, что трансгенные мыши C57BL/6 с сверхэкспрессией Tgx1 человека более резистентны к разным видам окислительного стресса и отличаются большей продолжительностью жизни по сравнению с контрольными мышами [67]. Они обладают устойчивостью к церебральному инфаркту [68], кардиотоксичности доксорубина и блеомицина [50], пневмонии [70], почечной ишемии-реперфузии [71]. Эмбрионы трансгенных по Tgx1 мышей могут развиваться нормально даже в условиях окислительного стресса [72].

Следует отметить способность экзогенного Tgx1 проникать в клетки, вызывая снижение образования АФК и препятствуя возникновению апоптоза [73], что используется в настоящее время при создании лекарственных препаратов на основе Tgx1, в частности для терапии острых воспалительных процессов в легких [69]. Кроме того, действие экзогенного Tgx1 подавляет развитие аутоиммунного миокардита [74]. Продолжительное внутривенное введение рекомбинантного Tgx1 способствует уменьшению очага церебрального

инсульта [75]. Обнаружено, что уровень Tgх1 понижается в аорте крыс со спонтанной гипертензией [76]. Установлено также, что использование соединений, индуцирующих Tgх1, может быть перспективным для предотвращения развития гипертензии.

Как уже отмечалось выше, сверхэкспрессия гена *TXN1* обеспечивает защиту от окислительного стресса и уменьшает токсичность ряда ксенобиотиков [48–51]. В то же время обнаружено, что сверхэкспрессия гена *TXN2* может способствовать развитию резистентности к апоптозу, индуцируемому АФК [25], а также резистентности эмбриональных почечных клеток человека к действию этопозида [24]. Последний факт вызывает большой интерес, так как этопозид оказывает различного рода дозо-зависимые воздействия на сигнальные пути митохондриального апоптоза [77], чувствительные к влиянию Tgх2. Кроме того, Tgх2 может взаимодействовать с компонентами дыхательной цепи митохондрий [78]. Так, установлено, что Tgх2 может образовывать комплекс с цитохромом *c* [79], тогда как сверхэкспрессия его гена (*TXN2*) вызывает повышение $\Delta\Psi_m$ митохондрий [24]. Результаты, свидетельствующие о способности Tgх2 связываться с цитохромом *c* [79], и данные о важной роли цитохрома *c* в развитии апоптоза [80] позволяют предполагать, что Tgх2 может освобождаться в ответ на стимулы, активирующие апоптоз, и играть защитную роль в регуляции программированной клеточной гибели, прежде всего посредством его влияния на образование апоптосомы и активацию каспаз, активное состояние которых требует восстановленных остатков Cys [81].

Также как Tgх2, Tgх1 может контролировать механизм апоптоза [9]. Внесение Tgх1 в культуральную среду предотвращает апоптоз, индуцированный в клетках нейробластомы рядом оксидантов [48], тогда как сверхэкспрессия гена *TXN1* приводит к снижению апоптоза опухолевых клеток при карциноме желудка [82]. Напротив, трансфектные лимфатические клетки, экспрессирующие редокс-неактивный Tgх1, проявляют повышенную чувствительность к апоптозу, индуцированному различными ксенобиотиками [83].

Механизмы, посредством которых Tgх1 влияет на апоптоз, пока мало изучены. Возможно, он непосредственно взаимодействует с АФК, хотя, по-видимому, более важными для этой функции Tgх1 является его влияние на сигнальные пути. Так, Tgх1 может связываться с киназой 1, регулирующей апоптотические сигналы (ASK-1), образуя неактивный комплекс [84]. Ряд факторов, индуцирующих апоптоз, особенно окислительный стресс, могут разрушать этот комплекс, активируя киназу 1, что приводит к активации JNK/p38 MAP-киназ и апоптозу [85].

JNK и p38 – зависимые пути клеточного сигналинга изучены достаточно подробно и включают MAP-киназ-зависимый сигнальный каскад, который, как правило, включает три уровня протеиновых киназ: MAPKKK, MAPKK и MAPK [86-88]. Последний фермент активируется путем последовательного фосфорилирования и затем, в свою очередь, регулирует активности нижележащих транскрипционных факторов и/или других киназ, осуществляя контроль экспрессии определенных генов.

ASK-1, идентифицированная как MAPKKK, активируется SEK1-JNK и MKK3/MKK6-p38 сигнальными каскадами [89]. Предполагается, что ASK-1 является ключевым элементом в механизме цитокин-зависимого и стресс-индуцированного апоптоза. Обнаружено, что сверхэкспрессия ASK-1 индуцирует апоптоз, тогда как ее неактивный мутант (ASK-1-K709R) вызывает подавление апоптоза, индуцированного TNF- α [89, 90]. Данные, полученные на ASK-1-дефицитных мышах, также показывают, что длительная активация JNK/p38 и апоптоз, индуцированный фактором некроза опухоли (TNF- α) и АФК, требует активации ASK-1 [85].

Trx1 является ключевым регулятором функций ASK-1. Его восстановленная форма связывается непосредственно с N-концевым фрагментом ASK-1, подавляя как активность ASK-1, так и ASK-1-зависимый апоптоз. Снижение уровня Trx1 вызывает активацию эндогенной ASK-1 [84]. Установлено, что HIV Nef белок ингибирует активность ASK-1, предотвращая освобождение Trx1 из Trx1-ASK-1 комплекса [91]. Обнаружено также, что Trx1 является чувствительным к S-нитрозилированию, что может приводить к диссоциации Trx1-ASK-1 комплекса и активации ASK-1 [92].

Некоторые данные позволяют считать, что Trx1 может способствовать убиквитированию ASK-1 и ее деградации в эндотелиальных клетках [93]. Как отмечалось выше, ингибирующее действие Trx1 на ASK-1 зависит от окисленного состояния Trx1 [84]. По-видимому, Trx1 может формировать стабильный комплекс с ASK-1 через любой из его остатков Cys [93]. Установлена также возможность образования подобного комплекса между Cys-остатками Trx1 и TrxR1 (через Cys32) или Trx1 и NF-kB (через Cys35) [94, 95].

Регуляция активности транскрипционных факторов Trx1 связана с его способностью восстанавливать тиолы, являющиеся критическими для связывания с ДНК [96]. Идентифицировано, по крайней мере, 64 редокс-регулируемых транскрипционных фактора [97, 98]. Многие из них имеют критические остатки Cys и могут регулироваться Trx-зависимой системой [99, 100]. В частности, это установлено

для таких транскрипционных факторов как p53, NF-kB, AP-1, Nrf2, каждый из которых является тиол-зависимым и связан с клеточной пролиферацией и механизмом апоптоза [101–106].

Наиболее полно изучен процесс активации NF-kB, который включает 3 этапа: 1) фосфорилирование ингибиторной IкВ субъединицы, 2) ее диссоциацию из неактивного комплекса и 3) деградацию IкВ субъединицы. У отдельных типов клеток АФК могут активировать NF-kB, тогда как антиоксиданты препятствуют этой активации. Кроме того, индукторы NF-kB, такие, например, как TNF- α , стимулируют повышение уровня образования АФК. Для транслокации NF-kB через ядерную мембрану и связывания с ДНК необходимо восстановление критических остатков Cys. Поэтому клеточный редокс-статус является ключевым для контроля состояния активации NF-kB [107]. Установлено, что для восстановления NF-kB необходимы как GSH, так и Tx1 [30, 108]. Так, сверхэкспрессия Tx1 и его транслокация в ядро приводит к усилению NF-kB-опосредованной экспрессии генов [30]. Установлено также, что Tx1 может активировать NF-kB, усиливая деградацию IкВ опосредовано через JNK-сигнальный путь [109, 110].

Связывание с ДНК транскрипционного фактора AP-1, представляющего собой гомодимерный (Jun-Jun) или гетеродимерный (Fos-Jun) комплекс, опосредуется фактором Ref-1. Совместно с восстановленной формой Tx1 фактор Ref-1 усиливает ДНК-связывание AP-1 [29].

Tx1-система может оказывать влияние на p53 – редокс-чувствительный опухолевый супрессор, обладающий множественными функциями [111]. p53 имеет несколько критических остатков Cys в ДНК-связывающем домене, часть которых необходима для координации связывания цинка при формировании домена «цинкового пальца», тогда как другие используются для связывания с ДНК [112]. Так как оба типа связывания требуют восстановленного состояния SH-групп, то Tx1 может непосредственно или через фактор Ref-1 повышать активность p53 в ядре [81].

Поскольку все транскрипционные факторы, имеющие критические остатки Cys в ДНК-связывающих доменах, восприимчивы к окислению, Tx1 способен поддерживать их в восстановленном, функциональноактивном состоянии. Большая часть данных свидетельствует о том, что основная редокс-зависимая регуляция Tx1 наиболее вероятно происходит в цитоплазме, где осуществляются ключевые процессы сигнального механизма. В то же время в ряде работ показано, что Tx1 может обеспечивать регуляцию транскрипции определенных генов в ядре [55]. Для окончательного выяснения функций ядерного и цитоплазматического Tx1 в регуляции генной экспрессии необходимы дополнительные исследования.

Ряд генов, продукты которых играют важную роль в защите организма от действия окислительного стресса или ксенобиотиков, содержат в промоторной области генетический элемент, отвечающий за антиоксидантную защиту (ARE – antioxidant responsive element), регуляция которого осуществляется путем связывания с Nrf2, образующего гетеродимер с низкомолекулярными Maf белками [113]. В норме Nrf2 находится в цитоплазме в виде комплекса с белком Keap1. В ответ на окислительный стресс Суs-остатки в Keap1 окисляются, Nrf2 высвобождается, транслоцируется в ядро и связывается с ARE-содержащими промоторами генов [114]. Хотя окислительный стресс в цитоплазме способствует активации Nrf2, следует отметить, что окислительные условия в ядре ингибируют связывание Nrf2 с ARE [104]. В то же время установлено, что Trx1 в восстановленном состоянии может усиливать связывание Nrf2 с ARE, вызывая его активацию [68]. Следует отметить, что транскрипция гена *TRX1*, в свою очередь, регулируется через ARE. Предполагается, что такой механизм самоусиливающегося действия Trx1 позволяет ускорить ответ клеток на окислительные воздействия и эффективно поддерживать окислительно-восстановительный баланс [115]. В клетках млекопитающих среди изоформ TrxR индуцибельной является цитоплазматическая селенсодержащая TrxR1, синтез которой на транскрипционном уровне также регулируется ARE. Повышение активности TrxR в клетках гепатом мыши и человека (HepalC1c7 и Hep2) наблюдалось при действии «классических» активаторов ARE (сульфорана, *трет*-бутилгидрохинона и β -нафтофлавона) и сопровождалось усилением синтеза мРНК TrxR1 [79]. В клетках эндотелия бычьих артерий ионы кадмия, диэтилмалеат и арсенит индуцировали синтез Trx1 и TrxR1 посредством стимуляции регуляторного элемента Nrf2-ARE [116].

Электрофильные соединения, постоянно образующиеся при метаболизме ксенобиотиков, благодаря высокой реакционной способности могут оказывать значительное токсическое действие. Одним из наиболее электрофильных альдегидов является акролеин [117], образующийся в результате активации перекисного окисления липидов [118] и окисления ОН-содержащих аминокислот миелопероксидазой [119]. Акролеин является также продуктом метаболизма циклофосамида, спермина, спермидина, аллилового спирта и аллиламина [120]. При сублетальных дозах, он снижает пролиферацию [121, 122], а при высоких – вызывает значительное повреждение клеток и тканей.

Акролеин индуцирует большинство генов, регулируемых ARE [123], легко реагирует с нуклеофилами, особенно с клеточными тиолами, в частности с GSH [121, 124]. Кроме того, акролеин взаимодействует с SH-группами Trx1 и TrxR1 [125]. Обнаружен быстрый синтез Trx1 под действием акролеина, что согласуется с данными об индукции экспрессии гена *TXN1* электрофилами [104].

Снижение уровня Trx1 и GSH электрофилами влияет на активацию транскрипционных факторов. Например, ингибирование активности NF-κB наблюдается как в случае потери активности регуляторных тиолов Trx1 и GSH после действия акролеина [124, 126], так и в результате непосредственного связывания акролеина с критическими остатками Cys в субъединицах самого транскрипционного фактора [127]. Влияние акролеина на p53 и AP-1 также осуществляется путем его непосредственного связывания с критическими остатками Cys транскрипционного фактора [124, 128, 129].

Таким образом, несмотря на то, что механизм участия Trx в процессах модулирования токсичности или сигнальной активности ксенобиотиков еще не до конца изучен, растущее число работ в этом направлении служит доказательством особой роли Trx в этих процессах.

III. ТИОРЕДОКСИНРЕДУКТАЗЫ

TrxR (КФ1.8.1.9, систематическое название «тиоредоксин:НАДФН-оксидоредуктаза») является НАДФН-зависимым гомодимером оксидоредуктазы (с одним ФАД на субъединицу), которая восстанавливает активный центр дисульфида в окисленном Trx [55, 62, 130, 131]. Молекулярная масса субъединицы TrxR млекопитающих составляет 55–65 кДа, у прокариот, растений и дрожжей – 35 кДа [55, 62, 132].

Выявлены и охарактеризованы три изоформы TrxR млекопитающих: цитоплазматическая (TrxR1), митохондриальная (TrxR2) и TrxR, катализирующая восстановление как Trx, так и GSSG и называемая тиоредоксинглутатионредуктазой (TGR), высокое содержание которой обнаружено в семенниках [133–135]. Все три изоформы обладают одинаковой структурой домена и характеризуются наличием селеноцистеина (Sec) в С-концевом активном центре (Gly–Cys–Sec–Gly–COOH). В то же время у цитозольной мРНК TrxR1 обнаружены три 5'-нетранслируемые области и наличие альтернативного АТГ кодона в структуре гена [136, 137], значение которых пока не ясно. Изоформа TGR отличается наличием дополнительного N-концевого монотиольного домена [135].

Существование TGR является иллюстрацией перекрывания функций у Trx- и GSH-систем. У *Drosophila melanogaster*, например, глутатионредуктаза отсутствует и восстановление GSSG осуществляется исключительно Trx-зависимой системой [138].

Очищенная форма TrxR1 млекопитающих впервые была получена и охарактеризована в 1977 году [139]. Следует подчеркнуть важность Se для ферментативной активности TrxR [140–143]. Предполагается, что наличие Se снижает потенциал восстановления остатков Cys, повышает эффективность работы ферментов при низких значениях pH и расширяет спектр восстанавливаемых соединений [144]. Отмечается, что активность TrxR снижается при дефиците Se у животных и в клеточных линиях человека [145, 146]. В то же время, добавление Se к культурам опухолевых клеток человека в несколько раз повышает активность TrxR в отличие от других Se-содержащих ферментов, включая глутатионпероксидазу [147].

TrxR млекопитающих имеет большое сходство с другими дисульфидоксидоредуктазами (такими, как глутатионредуктаза или липоамиддегидрогеназа) по первичной структуре [141, 148] и особенностям каталитического механизма [149]. В то же время, TrxR обладает C-концевым Sec-содержащим доменом, которого нет ни в липоамиддегидрогеназе, ни в глутатионредуктазе [141], что объясняет многие уникальные свойства этого фермента.

Механизм катализа TrxR млекопитающих включает процесс восстановления TrxR с участием НАДФН, сходный с аналогичным процессом для глутатионредуктазы и липоамиддегидрогеназы [143, 149, 150]. Вначале осуществляется перенос электрона с НАДФН через ФАД на дисульфид в активном центре, образованном остатками Cys в положении 59 и 64 в N-концевом домене, который идентичен аналогичному домену в глутатионредуктазе. Затем электроны переносятся от образовавшегося дитиола одной субъединицы в димерном ферменте на селенилсульфид в C-концевой последовательности другой субъединицы. Такой перенос электронов на другую субъединицу может иметь место и при восстановлении GSSG глутатионредуктазой [143]. Восстановленный C-концевой Sec участвует в восстановлении многочисленных субстратов TrxR1 у млекопитающих.

Активный центр TrxR, по-видимому, в значительной степени защищен за счет окисления с образованием селенилсульфида. В таком окисленном состоянии фермент устойчив к действию карбоксипептидазы и трипсина [141, 151], а также к образованию производных с электрофильными соединениями [152]. Эти факты указы-

вают на возможность определенных конформационных изменений в области активного центра в процессе восстановления/окисления, с чем, по-видимому, и связана способность TrxR к восстановлению большого числа различных субстратов благодаря легкой доступности активного центра фермента в восстановленном состоянии.

Действительно, для TrxR млекопитающих характерна широкая субстратная специфичность и способность к непосредственному восстановлению дисульфидов различных белков, многих низкомолекулярных дисульфидов и соединений, не являющихся дисульфидами. При этом большой ряд дисульфидов восстанавливается опосредованно через тиоредоксин, восстановленный TrxR. В частности, GSSG и инсулин не являются субстратами для TrxR1, хотя оба они могут эффективно восстанавливаться Trx1 [139, 153].

Перекиси, включая гидроперекиси липидов и H_2O_2 , могут непосредственно восстанавливаться TrxR1 [5, 6]. Посредством этого механизма TrxR1 функционирует как альтернативный путь ферментативной детоксикации гидроперекисей липидов. Однако, высокое значение K_m TrxR1 для H_2O_2 (2,5 мМ) делает значимой роль фермента только при повышении уровня H_2O_2 [5].

Протеиндисульфидизомеразы (PDI) – семейство белков в эндоплазматическом ретикулуме, играющих важную роль в посттрансляционном фолдинге и процессинге белков. Эти белки содержат один или несколько тиоредоксиновых доменов, некоторые из них имеют редокс-активные дитиол-дисульфидные участки [154], структурно подобные активному центру Trx, и восстанавливаются как Trx1, так и TrxR1 [155, 156].

TrxR1 восстанавливает также различные низкомолекулярные соединения, включая антибактериальные полипептиды [157], цистин, аллоксан [158] и витамин K [159].

Восполнение аскорбата за счет восстановления дегидроаскорбиновой кислоты играет важную роль в системе антиоксидантной защиты, так как он является одним из основных водорастворимых низкомолекулярных антиоксидантов. Аскорбат восстанавливает α -токоферол, пероксиды и O_2^- [160], предотвращает образование гидроперекисей липидов, что имеет большое значение, поскольку способствует снижению риска образования атеросклеротических бляшек [161]. В случае значительного снижения внутриклеточного содержания GSH альтернативным механизмом восстановления дегидроаскорбиновой кислоты становится функционирование Trx-зависимой системы [7], однако вопрос о ее вкладе в восстановление дегидроаскорбата в разных клетках до сих пор окончательно не

решен. В некоторых клетках дегидроаскорбиновая кислота восстанавливается независимо от GSH и НАДФН, что предполагает существование дополнительного механизма метаболизма аскорбата [162].

Уместно заметить, что поскольку аскорбат участвует в восстановлении α -токоферола, а TrxR1 восстанавливает дегидроаскорбат, то TrxR1 может играть важную роль в регуляции антиоксидантной функции витаминов С и Е, являясь звеном, связывающим эти системы [163].

В восстановлении витаминов С и Е участвует и липоевая кислота, которая также восстанавливает GSH [164], обладает свойствами хелатора металлов и может играть роль «ловушки» свободных радикалов [165]. Высокую восстанавливающую способность липоевая кислота приобретает после восстановления в дигидролипоевую кислоту [166], которое осуществляется липоамиддегидрогеназой, глутатионредуктазой, TrxR1 и TrxR2 [8, 167, 168]. Сравнение кинетических параметров показывает, что величина соотношения k_{cat}/K_m для TrxR1 превышает таковое для глутатионредуктазы, однако оно ниже, чем для липоамиддегидрогеназы, в то время как K_m липоамиддегидрогеназы значительно выше, чем для TrxR1, что свидетельствует о важной роли TrxR1 в восстановлении липоевой кислоты. В отличие от цитозольной TrxR1 митохондриальная TrxR2 менее эффективна [8].

TrxR1 восстанавливает многие Se-содержащие соединения, в том числе селенит [169] и Se-содержащий активный центр глутатионпероксидазы в плазме [170]. Для активной инкорпорации Se в Se-содержащие белки необходим переход неорганического Se, например, в форме селенита (SeO_3^{2-}), в селенид (HSe^-). Это восстановление может катализироваться TrxR1 с участием или без Trx1 [169], либо включает образование селенодиглутатиона (GS-Se-SG) как интермедиата. Образование GS-Se-SG требует присутствия GSH, уровень которого поддерживается глутатионредуктазой, которая может и непосредственно восстанавливать GS-Se-SG [171]. Однако TrxR1 также высоко эффективна в восстановлении GS-Se-SG [172]. Таким образом, TrxR1 играет существенную роль в метаболизме Se-содержащих соединений [173] и является важным звеном, связывающим метаболизм Se и антиоксидантные процессы.

IV. ПЕРОКСИРЕДОКСИНЫ

Пероксиредоксины (Prx, КФ 1.11.1.15), образующие суперсемейство Se-независимых пероксидаз, открыты около 10 лет назад. Prx осуществляют ферментативную деградацию H_2O_2 , органических гидропероксидов, пероксинитрита [3, 4]. Они обнаружены у бактерий,

растений и млекопитающих. В отличие от Тгх, имеющих активный двухцистеиновый участок и образующих при окислении внутримолекулярную дисульфидную связь, Ргх не имеют таких участков, однако присутствующие в их структуре легкоокисляющиеся остатки Сус способны образовывать межмолекулярные дисульфидные связи [144]. По числу активных остатков Сус пероксиредоксины млекопитающих подразделяются на типичные двухцистеиновые (Ргх1–Ргх4), атипичные двухцистеиновые (Ргх5) и одноцистеиновые (Ргх6). Все они содержат фиксированные остатки Сус на N-концевых участках молекул, а изоформы Ргх1 – Ргх4 имеют еще дополнительно аналогичные остатки Сус на С-конце молекул [4].

Ргх1 – Ргх5 в качестве донора электронов используют Тгх, тогда как Ргх6 использует GSH [174]. Хотя каталитическая активность Ргх в отношении H_2O_2 (10^5 – $10^6 M^{-1}\cdot c^{-1}$) ниже, чем у глутатионпероксидазы ($10^8 M^{-1}\cdot c^{-1}$) и каталазы ($10^6 M^{-1}\cdot c^{-1}$), тем не менее они играют важную роль в детоксикации H_2O_2 [144]. Восстановление H_2O_2 всеми Ргх проходит через стадию образования сульфеновой кислоты (Сус–SOH) в результате окисления SH-группы остатка Сус, однако механизм пероксидазной реакции у разных изоформ Ргх несколько различается.

Типичные двухцистеиновые Ргх1–Ргх4 являются гомодимерами и их взаимодействие с H_2O_2 приводит к образованию сульфеновой кислоты, которая может участвовать в формировании межпептидной дисульфидной связи, восстанавливаемой действием Тгх. Аналогичный механизм установлен для Ргх5, однако последний является мономером и образует внутримолекулярную дисульфидную связь между Сус47 и Сус151 [144, 175]. Ргх6 использует в качестве источника электронов не Тгх, как другие пероксиредоксины, а низкомолекулярные тиолы, в том числе GSH [174]. Кроме того, Ргх6 восстанавливает гидроперекиси фосфолипидов и обладает активностью фосфолипазы A_2 [174]. Механизм восстановления H_2O_2 при действии Ргх6 включает окисление в сульфеновую кислоту активного Сус47, который в дальнейшем восстанавливается до дисульфида за счет S-глутатионилирования при условии гетеродимеризации Ргх6 с глутатионтрансферазой Р1-1 [176]. Образовавшийся дисульфид восстанавливается далее неферментативно GSH, что приводит к восстановлению функциональной активности Ргх6.

Поскольку H_2O_2 может быстро превращаться в высокотоксичные АФК, такие как $O_2^{\cdot -}$ радикалы, то повышение ее уровня может приводить к развитию окислительного стресса [177], вызывающего разрывы в ДНК, сшивки в молекулах белков и активацию перекисного

окисления липидов [178]. Физиологическая роль Prx, связанная с ферментативной деградацией H_2O_2 , особенно значима в эритроцитах, в которых эти ферменты являются вторыми или третьими по содержанию белками [179].

Важная роль Prx в защите от окислительного стресса была продемонстрирована циклом работ с нокаутом генов, соответствующих Prx. Так, у мышей, нокаутных по гену *PRDX1*, наблюдалось появление гемолитической анемии, характеризующейся нестабильностью гемоглобина [180]. У мышей, нокаутных по гену *PRDX2*, обнаружено значительное снижение времени полужизни, также сопровождающееся развитием анемии [181]. В обоих случаях нокаут по соответствующему гену вызывал значительное повышение уровня АФК в эритроцитах. Мыши, нокаутные по гену *PRDX6*, характеризовались низкой степенью выживаемости, высоким уровнем окисления белков и значительными повреждениями почек, печени и легких. Следует отметить, что в этом случае уровень экспрессии генов таких антиоксидантных ферментов, как каталаза, глутатионпероксидаза и Mn-SOD не отличался от такового у мышей дикого типа. Результаты исследований позволяют предполагать, что функция Prx6 не может быть компенсирована экспрессией других генов [182].

Однако H_2O_2 не только способствует развитию окислительного стресса, но при низких концентрациях может выступать в роли вторичного мессенджера, участвующего в передаче внутри клетки сигналов, идущих от различных поверхностных рецепторов [183, 184]. Образующаяся при действии экстраклеточных сигналов H_2O_2 быстро элиминируется после выполнения своей функции. Согласно этим представлениям Prx могут регулировать пути клеточной сигнальной трансдукции путем контроля уровня H_2O_2 [183]. Действительно, было установлено, что в трансфектных клетках сверхэкспрессия генов *PRDX1* и *PRDX2* приводила к снижению внутриклеточного уровня H_2O_2 , вызванного действием эпидермального фактора роста, а также ингибировала H_2O_2 - и TNF α -зависимую активацию транскрипционного фактора NF-kB [185]. На культуре клеток эмбриональных фибробластов показано, что сверхэкспрессия гена *PRDX2* вызывает определенную модификацию H_2O_2 -зависимой активации киназ JNK и p38 в ответ на действие TNF α [186]. Авторы пришли к выводу, что Prx могут дополнять действие других антиоксидантных ферментов в качестве модулятора внутриклеточных редокс-зависимых сигнальных путей [183, 186]. Аналогичные результаты были получены для TNF α -зависимой активации транскрипционного фактора AP-1, которая снижалась при

сверхэкспрессии гена *PRDX2* в культуре трансфектных эндотелиальных клеток [187]. В культуре тиреоидных клеток сверхэкспрессия генов *PRDX1* и *PRDX2* приводила к элиминации H_2O_2 (уровень которой был значительно повышен под действием тиреотропина) и защищала клетки от апоптоза, вызванного действием H_2O_2 [188].

При исследовании кристаллической структуры Prx было установлено, что два функционально активных остатка Cys действуют как потенциальные клеточные сенсорные системы, определяющие роль H_2O_2 либо как токсичного оксиданта, либо как сигнальной молекулы [189]. Предложена модель, согласно которой чувствительность к H_2O_2 у пероксиредоксинов коррелирует со структурными изменениями в этих белках. На основании этой модели сделано предположение, что высокий внутриклеточный уровень Prx с двумя функционально активными остатками Cys может удерживать низкий уровень H_2O_2 в покоящихся клетках. Напротив, когда уровень H_2O_2 возрастает (например, в клетках, обработанных TNF α), окисление редокс-чувствительных остатков Cys ведет к понижению их пероксидазной активности и высокий уровень H_2O_2 активирует в клетке определенные редокс-зависимые сигнальные пути. При этом авторы рассматривают Prx млекопитающих, содержащие два активных остатка Cys, как «ворота» для пероксидов, открытые при определенных условиях.

Характер экспрессии генов различных изоформ Prx имеет клеточную, тканевую и органную специфичность. Так оказалось, что Prx1 является наиболее широко представленным и высоко экспрессируемым членом семейства пероксиредоксинов практически во всех органах и тканях мышей и человека как в нормальных тканях, так и в злокачественных опухолях [190–192]. В частности, следует отметить, что ген *PRDX1* широко экспрессируется в различных областях центральной и периферической нервной системы, причем специфичность экспрессии зависит от типа клеток [193]. Для печени, семенников, яичников и мышц характерна высокая экспрессия гена *PRDX4*, тогда как низкая наблюдается в тонком кишечнике, плаценте, легких, почках, селезенке и тимусе [190]. Гены изоформ Prx1, Prx2 и Prx3 повсеместно экспрессируются в коже крыс [194]. В эпидермисе гены изоформ Prx1 и Prx2 экспрессируются во всех слоях с повышением уровня экспрессии от базального до гранулярного слоя. Присутствие белка Prx3 также обнаружено во всех слоях, но в обратном порядке (наибольшая концентрация – в базальном слое). После УФ-облучения отмечено лишь значительное повышение уровня Prx2 [194].

Баст с соавт. обнаружили присутствие Ptx1 и Ptx2 в панкреатических β -клетках островков Лангерганса, тогда как в α -клетках экспрессия их генов отсутствовала [195]. Различный характер экспрессии генов изоформ Ptx обнаружен в легких и бронхах [196]. В бронхиальных эпителиальных клетках установлен умеренный или высокий уровень Ptx1, Ptx3, Ptx5 и Ptx6; в альвеолярном эпителии присутствуют в основном Ptx5 и Ptx6, а в альвеолярных макрофагах – Ptx1 и Ptx6. Следует отметить, что в системе антиоксидантной защиты верхних дыхательных путей млекопитающих вклад Ptx6 составляет практически 75% [197, 198], поэтому при острых воспалительных процессах аппликация Ptx6 существенно сокращает время регенерации ткани. В связи с этим в настоящее время делаются попытки создания лекарственных препаратов на основе Ptx6.

Ptx присутствуют во всех субклеточных компартментах, где также наблюдается определенная специфичность экспрессии генов разных изоформ фермента [4]. Во внутриклеточных органеллах наиболее широко представлен Ptx1 [199]. Помимо Ptx1 в цитоплазме, пероксисомах, митохондриях и ядре обнаружен Ptx5 [200, 201]. В отличие от Ptx1 и Ptx5 другие изоформы имеют более ограниченную субклеточную локализацию. Так, Ptx2 присутствует в ядре и цитоплазме, секретируемый Ptx4 – в цитоплазме и лизосомах, Ptx3 – в митохондриях, Ptx6 – в цитоплазме [4].

Регуляция экспрессии генов Ptx может осуществляться как на уровне транскрипции, так и за счет посттранскрипционной модификации [202]. На экспрессию гена *PRDX1* влияет большое число факторов, стимулирующих окислительный стресс в макрофагах мышей [203]. Отмечена его индукция гемом и тяжелыми металлами в культуре гепатоцитов и липополисахаридами в макрофагах крыс [204]. Во всех приведенных случаях обнаружено, что индукция экспрессии этого гена наблюдается одновременно с экспрессией стресс-индуцибельного гена *HO-1*, продуктом которого является гемоксигеназа-1 – скорость-лимитирующий фермент деградации гема [205, 206]. Параллельная индукция экспрессии *PRDX1* и *HO-1* генов обнаружена также в культуре гладкомышечных клеток сосудов под действием окисленных липопротеинов низкой плотности [207] и в экспериментах *in vivo* в ишемических очагах мозга крысы [208]. По-видимому, скоординированная индукция генов *PRDX1* и *HO-1* является общим адаптивным ответом клеток в качестве защиты от окислительного стресса. Кроме того, стресс-зависимая индукция экспрессии гена отмечена и для других изоформ Ptx, таких как Ptx2 и Ptx6 [195, 209].

Следует подчеркнуть, что основная роль в регуляции экспрессии гена *PRDX1* электрофильными и АФК-продуцирующими агентами принадлежит транскрипционному фактору Nrf2 [210]. Это подтверждается данными об отсутствии экспрессии этого гена при действии стресс-стимулирующих факторов в культуре макрофагов мышей, нокаутных по гену *NRF2* [211]. Хотя Nrf2 является ключевым регулятором экспрессии гена *PRDX1*, ряд данных указывает на участие в регуляции этого гена и других транскрипционных факторов. Так, на культуре макрофагов крыс установлена экспрессия гена *PRDX1* через AP-1-зависимый механизм при действии 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата (ТРА) [212]. При этом обнаружен вклад протеинкиназы С и белка Ras, активирующего р38 MAPK-сигнальный путь [213, 214]. Найдено, что при действии арсената натрия на культуру остеобластов ПК8δ участвует в посттрансляционной индукции Prx1 [191]. Кроме того установлено, что липополисахариды могут индуцировать экспрессию гена *PRDX1* через NO-зависимый сигнальный каскад в культуре макрофагов крыс, возможно, через индукцию iNOS [215]. Регуляторная роль NO-зависимого сигнального пути также обнаружена при исследовании механизма индукции экспрессии генов *PRDX1* и *PRDX2* в культуре панкреатических клеток [195].

Активность Prx может модифицироваться посттрансляционными механизмами, включая фосфорилирование, редокс-зависимую олигомеризацию, протеолиз, лигандное связывание. Обнаружено, что фосфорилирование Prx1, Prx2, Prx3 и Prx4 по остаткам Тре циклин-зависимой киназой Cdc2 [216] ингибирует их пероксидазную активность. Механизм такого эффекта может объясняться негативным модулирующим действием отрицательно заряженной фосфатной группы на активный центр Prx посредством электростатического взаимодействия [216]. Prx могут также образовывать димеры и декамеры при изменении ионной силы и низких значениях pH. Активация процесса олигомеризации Prx вызывается изменениями состояния редокс-активного дисульфидного центра. Прямая функциональная связь редокс-статуса и олигомеризации установлена для Prx в бактериях [217]. Кроме того обнаружено, что частичный протеолиз с С-конца у типичных двухцистеиновых Prx повышает их устойчивость к окислению и, впоследствии, – к инактивации пероксидазной активности [218]. Активность Prx может также изменяться и за счет нековалентного связывания с лигандами, такими как гем и циклофиллин А. Prx1 вначале был идентифицирован как белок с высоким родством к гемму [219], причем связывание с гемом заметно

снижает его активность [220]. Напротив, пероксидазная активность Ptx6 возрастала после взаимодействия с циклофилином А [221]. В целом посттрансляционная модификация Ptx приводит к структурным и связанным с этим функциональным изменениям, что, по-видимому, имеет важное значение для этих ферментов как регуляторов клеточного редокс-гомеостаза.

Хорошо известно, что продукция АФК и клеточный редокс-статус играют существенную роль в регуляции клеточного цикла и клеточной пролиферации [222, 223]. Так установлено, что антиоксидантные ферменты, такие как глутатионпероксидаза или Mn-SOD, вовлечены в регуляцию клеточного цикла [224]. В то же время, Ираин с соавт. обнаружили существование АФК-зависимой регуляции клеточного цикла [225] и установили, что увеличение продукции АФК ускоряло клеточный цикл в культуре фибробластов и, напротив, действие антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина замедляло его [225]. Кроме того обнаружено, что в эмбриональных фибробластах мышей клеточный уровень АФК коррелирует с величиной периода клеточного цикла, тогда как сверхэкспрессия гена *SOD2* ингибирует клеточную пролиферацию [226].

Данные о связи Ptx1 с клеточной пролиферацией относятся к ранним работам по его изучению [227]. Так, было показано, что экспрессия гена *PRDX1* заметно выше в Ras-трансфектных эпителиальных клетках по сравнению с клетками дикого типа [227]. Корреляция уровня экспрессии гена *PRDX1* с клеточной пролиферацией была подтверждена в опытах на линии HL 60 промиелоцитов при действии диметилсульфоксида [227]. Кроме того установлено, что Ptx1 взаимодействует с протеинкиназами c-Abl и c-Myc, играющими важную роль в регуляции клеточной пролиферации [228]. У дрожжей Ptx1 может регулировать тирозинкиназную активность c-Abl, связываясь с третьим доменом в его структуре [228], что приводит к ограничению трансформирующей способности c-Abl. В связи с этим возникло предположение, что обратимое связывание Ptx1 с c-Abl может служить ключевым регулятором клеточного цикла. Обнаружено также, что Ptx1 может связываться с c-Myc через c-Myc-трансактивирующий домен [229]. Более того, в случае сверхэкспрессии гена *PRDX1* наблюдается снижение экспрессии ряда специфических для действия c-Myc генов [229].

Как уже отмечалось, Ptx могут специфично фосфорилироваться по остатку Тре90 через циклинзависимую киназу Cdc2, что приводит к снижению активности фермента [216]. Фосфорилирование Ptx1 происходит во время митоза, но не в интерфазе. В связи с этим пред-

полагается, что фосфорилирование Pгх может выполнять важную функцию «переключателя» в направлении повышения уровня H_2O_2 , а это, свою очередь, ведет к ускорению клеточного цикла [216]. Необходимо отметить другую особенность функциональной активности Pгх: благодаря пероксидазной активности эти белки могут ингибировать пролиферацию различных опухолевых клеток подобно другим антиоксидантным ферментам, в частности Mn-SOD [224]. Так, у мышей, нокаутных по гену *PRDX1*, наблюдается рост злокачественных опухолей, таких как лимфомы, саркомы, карциномы [180]. В связи с этим предполагается, что Pгх могут играть роль опухолевого супрессора.

Развитие клеточного цикла и апоптоз – связанные между собой процессы и нарушение регуляции активности Cdc2-киназы в клетках млекопитающих может приводить к запуску процесса апоптоза [230]. Известно, что одним из цитокинов, индуцирующих образование АФК в ходе передачи внутриклеточного сигнала, является $TNF\alpha$, который индуцирует апоптоз посредством связывания с death-доменом рецептора $TNF\alpha$ [231]. В этом процессе $TNF\alpha$ активирует транскрипционный фактор NF- κ B, участвующий в редокс-зависимой регуляции генов [184, 232]. Установлено, что сверхэкспрессия гена *PRDX2* ингибирует активацию NF- κ B после стимуляции клеток H_2O_2 [185], а сверхэкспрессия этого гена в клетках лейкемии Molt-4 оказывает защитное действие против апоптоза, вызываемого церамидом или этопозидом [233]. При этом обнаружено, что Pгх2 предотвращал выход цитохрома *c* из митохондрий и ингибировал перекисное окисление липидов. Интересно отметить, что сверхэкспрессия гена *PRDX1* также оказывает защитное действие на клетки, подвергнутые действию пероксидов [200, 234]. В то же время установлено, что сверхэкспрессия гена *PRDX1* может подавлять развитие апоптоза и усиливать устойчивость клеток к радиации путем ингибирования активности киназы JNK [235]. При этом обнаружено, что Pгх I может непосредственно связываться с комплексом GSTP/JNK, повышая его устойчивость.

На основании вышесказанного можно считать, что повышение уровня пероксиредоксина препятствует развитию апоптоза, усиливает антиоксидантный эффект и оказывает регулирующее действие на клеточную пролиферацию.

V. ГЛУТАРЕДОКСИНЫ

Глутаредоксины (Grx, КФ 1.20.4.1) – GSH-зависимые оксидоредуктазы с низкой молекулярной массой (9-14 кДа), относящиеся по своей структуре к суперсемейству тиоредоксинов и играющие важную роль в клеточных редокс-зависимых процессах. Grx обнаружены практически во всех таксономических группах, включая прокариоты, растения и эукариоты (от дрожжей до человека) [2]. В отличие от Trx у различных видов Grx имеют высокую степень гомологии аминокислотной последовательности, особенно в области активного центра [2].

В Grx-зависимой системе перенос электронов происходит от НАДФН-зависимой глутатионредуктазы на окисленный глутатион с образованием GSH, который, в свою очередь, восстанавливает окисленный глутаредоксин (рис. 2). Субстратами для Grx являются дисульфиды и смешанные дисульфиды. Восстановление дисульфидов, катализируемое Grx, может идти двумя путями – монотиольным и дитиольным с участием, соответственно, одного или двух остатков Cys в активном центре.

Структура дитиольных Grx имеет три характерные особенности: (1) участок аминокислотной последовательности CXXC (обычно Cys-Pro-Tyr-Cys) с двумя функционально активными тиолами в активном центре; (2) наличие определенной, поверхностно расположенной гидрофобной области и (3) участок связывания с GSH [236, 237].

При дитиольном механизме (рис. 3А) N-концевой остаток Cys в активном центре, осуществляя нуклеофильное взаимодействие, инициирует образование смешанного дисульфида между глутаредоксином и субстратом – белком, несущим дисульфидную связь [2]. Вторым свободным C-концевым остатком Cys депротонируется и взаимодействует с N-концевым атомом S с образованием окисленного фермента Grx-S₂ и восстановленного субстрата. Окисленная форма фермента восстанавливается при взаимодействии с GSH, образуя смешанный дисульфид (между GSH и N-концевым остатком Cys в активном центре), который, в свою очередь, восстанавливается второй

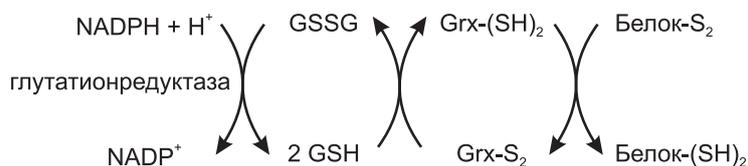


Рис. 2. Схема реакций, катализируемых глутаредоксин-зависимой системой.

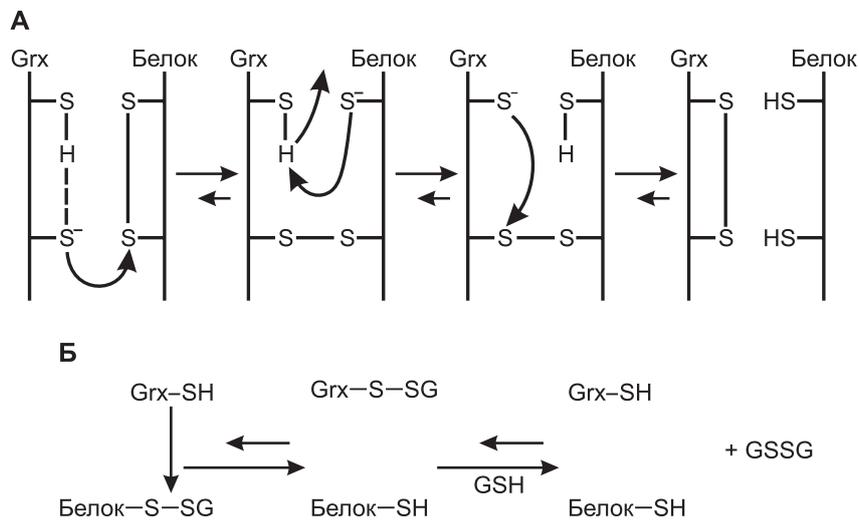


Рис. 3. Дитиольный (А) и монотиольный (Б) механизмы катализа глутаредоксина.

молекулой GSH. По дитиольному механизму Grx восстанавливает как низкомолекулярные дисульфиды, так и дисульфиды белков.

По монотиольному механизму (рис. 3Б), получившему название «деглутатионирование», происходит восстановление смешанных дисульфидов белков или глутатионированных белков, при этом Grx использует только N-концевой остаток Cys [2]. В этой реакции благодаря высокой аффинности к GSH фермент специфически взаимодействует с остатком GSH смешанного дисульфида – белком-S-SG [236, 237] с образованием интермедиата Grx-S-SG, который восстанавливается с помощью GSH. Образующийся GSSG восстанавливается до GSH глутатионредуктазой. Так как для восстановления глутатионированных белков требуется узнавание только GS-остатков, а не субстрата в целом, монотиольный механизм, приводящий к деглутатионированию, является, по-видимому, наиболее общей функцией Grx. В отличие от Grx для Trx характерна крайне низкая активность или полное ее отсутствие по отношению к смешанным дисульфидам.

Глутаредоксины функционально сопряжены с глутатионредуктазой и с соотношением GSH/GSSG. Соотношение GSH/GSSG является индикатором клеточного редокс-статуса и важной детерминантой редокс-потенциала, который коррелирует с биологическим статусом клетки, достигая, например, при пролиферации – 240 mV, при дифференцировке – 200 mV, а при апоптозе – 170 mV [238].

S-глутатионилирование белков является важным регуляторным механизмом биохимических процессов благодаря обратимой модификации тиолов белков [239, 240] и может катализироваться Grx и глутатион S-трансферазой [241]. Целый ряд белков претерпевает обратимое S-глутатионилирование при изменении внутриклеточного редокс-статуса. К таким белкам относятся, например, шапероны, белки клеточного цитоскелета и регуляторы клеточного цикла [242, 243]. Показано, что S-глутатионилирование Cys62 субъединицы p50 NF-kB и Cys269 c-Jun киназы приводит к потере их ДНК-связывающей активности [89, 244]. В то же время другие ферменты (тирозингидроксилаза, протеинфосфатаза 2A, тирозинфосфатаза 1B, α -кетоглутаратдегидрогеназа) обратимо ингибируются посредством S-глутатионилирования [245-248]. Установлено также, что G-актин может глутатионилироваться и деглутатионилироваться по остатку Cys374. Нокаут по гену *GLRX1* человека существенно влияет на способность G-актина к полимеризации и транслокации, а также на реорганизацию цитоскелета клетки [249, 250].

S-глутатионилирование служит также для предотвращения необратимого окисления SH-групп белков. В зависимости от степени окисления SH-группы образуются сульфеновая (Cys-SOH), сульфиновая (Cys-SO₂H) и сульфоновая (Cys-SO₃H) кислоты. Сульфоновая кислота не восстанавливается и ее появление приводит к протеасомальной деградации белка, напротив, сульфеновая и сульфиновая кислоты могут быть восстановлены Grx и Trx [241], причем Trx восстанавливает только первую кислоту, а Grx – обе кислоты до функционально активных SH-групп [1, 2].

В целом, в настоящее время считается доказанным, что образование смешанных дисульфидов тиолов белка с GSH является ключевым событием в регуляции клеточного ответа на окислительный стресс. Grx служит основным ферментом, катализирующим как образование, так и восстановление смешанных дисульфидов [251, 252]. В норме, как правило, процесс восстановления смешанных дисульфидов белков является более предпочтительным, однако в случае снижения концентрации GSH, а также повышения уровня GSSG (например, в условиях окислительного стресса) процесс образования смешанных дисульфидов преобладает над их восстановлением [253].

У млекопитающих и человека обнаружены три изоформы Grx: цитозольная Grx1 с аминокислотной последовательностью в активном центре Cys-Pro-Tyr-Cys и две митохондриальные – Grx2 и Grx5, активный центр которых содержит аминокислотные последовательности Cys-Ser-Tyr-Cys и Cys-Gly-Phe-Ser, соответственно [254, 255].

Grx1 и Grx2 являются дитиольными изоформами и содержат по два остатка Cys в активном центре, тогда как в изоформе Grx5 имеется лишь один остаток Cys. Изоформы Grx3 и Grx4 обнаружены только у низших эукариот.

Grx1 – белок с молекулярной массой 12 кДа, локализован в основном в цитозоле (хотя обнаружен и в ядре) [256], был открыт как GSH-зависимый донор для рибонуклеозидредуктазы [257]. По сравнению с Tgx, который, как правило, превышает по содержанию (10 мкМ) его уровень в клетке (1 мкМ), Grx1 имеет в 10 раз ниже значение K_m для рибонуклеозидредуктазы [258, 259]. Исследования показали, что основной вклад в образование дезоксирибонуклеотидов у *E. coli* вносит Grx1 и, в меньшей степени, – Tgx1 [260].

Осуществляя восстановление дисульфидов по дитиольному типу, изоформа Grx1 играет важную роль в дисульфид-тиольном обмене [130], посредством которого она, в частности, участвует в клеточной дифференцировке [261], регуляции активности транскрипционных факторов [262–264] и процесса апоптоза [265, 266]. Показано, что Grx1 оказывает протекторное действие на нейроны, защищая их от апоптоза, индуцированного допамином, путем активации NF- κ B с участием регуляторного фактора 1 [239, 266]. В ряде работ установлено, что Grx1, катализируя процесс деглутатионирования, восстанавливает функциональную активность таких белков, как глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, протеинтирозинфосфатаза 1B, креатинкиназа, c-Jun, субъединица p50 NF- κ B, каспаза-3 [245, 249, 267, 268]. Обнаружено также, что экспрессия гена *GLRX1* может значительно повышаться в опухолевых клетках [269].

Изоформа Grx2 (14 кДа) обнаружена в двух сплайсинговых формах – Grx2 α и Grx2 β , локализованных, соответственно, в митохондриях и в ядре [254, 270]. Эффективность Grx2 (k_{cat}/K_m) в катализе процесса деглутатионирования смешанных дисульфидов белков в 1,5–3 раза выше, чем у Grx1 [271]. Катализируя обратимое S-глутатионирование митохондриального комплекса I, функциональная активность которого сопровождается образованием O_2^- , Grx2 регулирует уровень АФК в митохондриях [272, 273]. Кроме того, Grx2 катализирует обратимое глутатионирование белков внутренней мембраны митохондрий в зависимости от изменения соотношения GSH/GSSG [272].

Окисленная форма Grx2 восстанавливается как GSH, так и TgxR2, причем последняя восстанавливает не только дисульфид, образованный остатками Cys в активном центре Grx2, но и смешанный дисульфид Grx2 с GSH (являющийся интермедиатом в реакции

деглутатионирования, катализируемой Grx2), а также ряд низкомолекулярных дисульфидов [271, 274], в том числе GSSG, дисульфид КоА, КоА-S-SG, Cys-S-SG и дегидроаскорбиновую кислоту [271]. Восстановление окисленной формы Grx2 за счет TrxR2 может происходить в условиях окислительного стресса, когда существенно повышается уровень GSSG и затруднено восстановление функционально активных SH-групп в активном центре Grx2 посредством восстановленного глутатиона.

Интересно отметить, что Grx2 является первым белком из семейства тиоредоксинов [275], который содержит [2Fe-2S] кластер, связывающий две молекулы Grx2 [276]. Димерный холофермент ферментативно не активен, однако деградация кластера и образование мономеров приводит к активации Grx2, что происходит при повышении уровня GSSG, а также в присутствии оксидантов [277]. В связи с этим предполагается, что изоформа Grx2 служит в качестве редокс-сенсора и функционально активный Grx2 образуется, когда необходим для защиты клетки, в частности от активации АФК-зависимого апоптоза.

Установлено, что Grx2 может подавлять развитие апоптоза посредством предотвращения выхода цитохрома *c* из митохондрий и окисления кардиолипина [278, 279]. Использование siРНК приводит к снижению внутриклеточного уровня Grx2 и значительному повышению апоптоза клеток HeLa, вызванного окислительным стрессом при действии доксорубина и оксида фениларсина, что сопровождается усилением токсического эффекта доксорубина в 60 раз, оксида фениларсина – в 40 раз [278]. Напротив, сверхэкспрессия гена *GLRX2* в этих клетках заметно снижает их чувствительность к апоптозу, вызываемому действием 2-диокси-D-глюкозы или доксорубина, предотвращает окисление кардиолипина, ингибирует выход цитохрома *c* из митохондрий и активацию каспаз [279]. Сверхэкспрессия митохондриального Grx2 оказывает более выраженное протекторное действие благодаря значительной роли Grx2 в поддержании митохондриального редокс-гомеостаза, чем сверхэкспрессия цитозольного мутанта, не имеющего сигнального участка митохондриальной транслокации [280].

Изоформа Grx5 человека имеет высокую степень гомологии с Grx5 дрожжей, в связи с чем эти белки получили одинаковое название [255]. Grx5 человека содержит N-концевой участок аминокислотной последовательности, обеспечивающий его транслокацию в митохондрии. Также как и у человека, Grx5 дрожжей и *E.coli* участвует в поддержании гомеостаза железа [255, 281, 282]. Нокаут по гену *GRDX5* у

дрожжей приводит к развитию окислительного стресса, аккумуляции железа в клетке и инактивации ферментов, содержащих [Fe-S] кластеры [281]. Установлено, что у дрожжей Grx5, по-видимому, необходим на этапе, следующем за стадией образования [Fe-S] кластера, когда происходит связывание кластера с апоферментом [283]. Недавно показано, что такой же функцией обладает и Grx5 человека [255, 284]. Кроме того, Grx5 человека активен в отношении смешанных дисульфидов белков и их дисульфидов [285].

Большой интерес вызывает существование особой категории изоформ Grx, к которой, в частности, относится Grx2 дрожжей. Их третичная структура отличается высоким сходством с глутатион-S-трансферазой и, одновременно, имеет Grx-подобный домен с характерной аминокислотной последовательностью Cys-Pro-Tyr-Cys с двумя функционально активными тиолами, определяющими Grx-подобную активность таких белков [286].

Grx наряду с Tx вносят существенный вклад в систему защиты клеток при развитии сердечно-сосудистых заболеваний [287]. Как и Tx1, Grx1 экспрессируется в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов и фибробластах [288]. Grx1 обнаружен также в плазме [289], тогда как Grx2 не секретируется из клеток [290]. Предполагается, что Grx1 осуществляет защитную функцию при атеросклерозе – в зонах развития атеросклероза инфильтрирующие макрофаги демонстрируют высокий уровень экспрессии гена *GLRX1* [288]. Обнаружено, также, что сверхэкспрессия гена *GLRX1* приводит к деглутатионированию белка Ras, ингибируя его активацию [291]. В то же время установлено, что одной из причин развития атеросклероза и рестеноза является АФК-зависимая активация белка Ras [292]. Grx2 и Grx5, локализованные в митохондриях кардиомиоцитов, также могут вносить определенный вклад в развитие и течение сердечно-сосудистых заболеваний, поскольку участвуют в поддержании гомеостаза железа [255, 278, 284].

Следует отметить, что глутаредоксин, как и тиоредоксин, играет важную роль в процессах формирования лекарственной резистентности опухолевых клеток к препаратам с прооксидантным эффектом, усиливая систему антиоксидантной защиты [25, 293–295].

Оба фермента функционально взаимосвязаны и дополняют друг друга, участвуя в контроле клеточного редокс-баланса. Установлено существование перекреста путей регуляции (cross-talk) между этими двумя системами в клетках млекопитающих [1]. При этом показано, что глутаредоксин может инактивировать тиоредоксин человека посредством глутатионирования по остатку Cys73.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные в обзоре данные позволяют говорить о важной роли тиолсодержащих редокс-белков – тиоредоксина, пероксиредоксина и глутаредоксина в поддержании клеточного редокс-гомеостаза и редокс-зависимой регуляции целого ряда внутриклеточных процессов, в том числе пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Сочетание антиоксидантных свойств и способности активировать транскрипцию генов, в том числе некоторых антиоксидантных ферментов, а также ингибировать редокс-зависимые пути активации апоптоза свидетельствуют о важном вкладе этих ферментов в антиоксидантную защитную систему. Они повышают устойчивость клеток к окислительному стрессу, предотвращая развитие ряда болезней, в частности, сердечно-сосудистых, острых воспалений легких, церебрального инсульта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Casagrande, S., Bonetto, V., Fratelli, M., Gianazza, E., Eberini, I., Massignan, T., Salmona, M., Chang, G., Holmgren, A., Ghezzi, P. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9745–9749.
2. Fernandes, A.P., Holmgren, A. (2004) *Antioxid. Redox Signal.*, **6**, 63–74.
3. Hofmann, B., Hecht, H.-J., Flohe, L. Peroxiredoxins (2002) *J. Biol. Chem.* **383**, 347–364.
4. Wood, Z.A., Schroder, E., Harris, J.R., Poole, L.B. (2003) *Trends Biochem. Sci.* **28**, 32–40.
5. Zhong, L., Holmgren, A. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 18121–18128.
6. Bjornstedt, M., Hamberg, M., Kumar, S., Xue, J., Holmgren, A. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 11761–11764.
7. May, J.M., Mendiratta, S., Hill, K.E., Burk, R.F. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 22607–22610.
8. Watabe, S., Makino, Y., Ogawa, K., Hiroi, T., Yamamoto, Y., Takahashi, S.Y. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **264**, 74–84.
9. Powis, G., Montfort, W.R. (2001) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**, 261–295.
10. Sadek, C.M., Jimenez, A., Dandimopoulos, A.E., Kieselbach, T., Nord, M., Gustafsson, J.A., Spyron, G., Davis, E.C., Oko, R., VanDerHoor, F.A., Miranda-Vizuete, A. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 13133–13142.
11. Bodnar, J.S., Chatterjee, A., Castellani, L.W., Ross, D.A., Ohmen, J., Cavalcoli, J., Wu, C., Dains, K.M., Catanese, J., Chu, M., Sheth, S.S., Charugundla, K., Demant, P., West, D.B., DeJong, P., Lusic, A.J. (2002) *Nat. Genet.*, **30**, 110–116.
12. Haendeler, J., Hoffmann, J., Tischler, V., Berk, B.C., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 743–749.
13. Rubartelli, A., Bajetto, A., Allavena, G., Wollman, E., Sitia, R. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 24161–24164.
14. Soderberg, A., Sahaf, B., Rosen, A. (2000) *Cancer Res.*, **60**, 2281–2289.
15. Powis, G., Mustacich, D., Coon, A. (2000) *Free Radic. Biol. Med.*, **29**, 312–322.
16. Tanudji, M., Hevi, S., Chuck, S.L. (2003) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **284**, C1272–C1279.

17. Rubartelli, A., Bonifaci, N., Sitia, R. (1995) *Cancer Res.*, **55**, 675–680.
18. Nakamura, H., Herzenberg, L.A., Bai, J., Araya, S., Kondo, N., Nishinaka, Y., Herzenberg, L.A., Yodoi, J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 15143–15148.
19. Jikimoto, T., Nishikubo, Y., Koshihara, M., Kanagawa, S., Morinobu, S., Morinobu, A., Saura, R., Mizuno, K., Kondo, S., Toyokuni, S., Nakamura, H., Yodoi, J., Kumagai, S. (2002) *Mol. Immunol.*, **38**, 765–772.
20. Yamada, Y., Nakamura, H., Adachi, T., Sannohe, S., Oyamada, H., Kayaba, H., Yodo, J., Chihara, J. (2003) *Immunol. Lett.*, **86**, 199–205.
21. Sumida, Y., Nakashima, T., Yoh, T., Nakajima, Y., Ishikawa, H., Mitsuyoshi, H., Sakamoto, Y., Okanoue, T., Kashima, K., Nakamura, H., Yodoi, J. (2000) *J. Hepatol.*, **33**, 616–622.
22. Bertini, R., Howard, O.M., Dong, H.F., Oppenheim, J.J., Bizzarri, C., Sergi, R., Caselli, G., Pagliei, S., Romines, B., Wilshire, J.A., Mengozzi, M., Nakamura, H., Yodoi, J., Pekkari, K., Gurunath, R., Holmgren, A., Herzenberg, L.A., Ghezzi, P. (1999) *J. Exp. Med.*, **189**, 1783–1789.
23. Spyrou, G., Enmark, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 2936–2941.
24. Damdimopoulos, A.E., Miranda-Vizuete, A., Pelto-Huikko, M., Gustafsson, J.-E., Spyrou, G.J. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 33249–33257.
25. Chen, Y., Cai, J., Murphy, T.J., Jones, D.P. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 33242–33248.
26. Rybnikova, E., Damdimopoulos, A.E., Gustafsson, J.E., Spyrou, G., Pelto-Huikko, M. (2000) *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 1669–1678.
27. Makino, Y., Yoshikawa, N., Okamoto, K., Hirota, K., Yodoi, J., Makino, I., Tanaka, H. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 3182–3188.
28. Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L., Fujii-Kuriyama, Y. (1999) *EMBO J.*, **18**, 1905–1914.
29. Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., Yodoi, J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 3633–3638.
30. Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K., Yodoi, J. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 27891–27897.
28. Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L., Fujii-Kuriyama, Y. (1999) *EMBO J.*, **18**, 1905–1914.
29. Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., Yodoi, J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 3633–3638.
30. Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K., Yodoi, J. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 27891–27897.
31. Didier, C., Kerblat, I., Drouet, C., Favier, A., Beani, J.C., Richard, M.J. (2001) *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 585–598.
32. Wei, S.J., Botero, A., Hirota, K., Bradbury, C.M., Markovina, S., Laszlo, A., Spitz, D.R., Goswami, P.C., Yodoi, J., Gius, D. (2000) *Cancer Res.*, **60**, 6688–6695.
33. Wiesel, P., Foster, L.C., Pellacani, A., Layne, M.D., Hsieh, C.M., Huggins, G.S., Strauss, P., Yet, S.F., Perrella, M.A.J. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 24840–24846.
34. Ueno, M., Masutani, H., Arai, R. J., Yamauchi, A., Hirota, K., Sakai, T., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Yodoi, J., Nikaido, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 35809–35815.
35. Takagi, Y., Horikawa, F., Nozaki, K., Sugino, T., Hashimoto, N., Yodoi, J. (1998) *Neurosci. Lett.*, **251**, 25–28.
36. Powis, G., Gasdaska, J.R., Baker, A. (1997) *Adv. Pharmacol.*, **38**, 329–359.

37. Watson, W.H., Pohl, J., Montfort, W.R., Stuchlik, O., Reed, M.S., Powis, G., Jones, D.P. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 33408–33415.
38. Shibata, T., Yamada, T., Ishii, T., Kumazawa, S., Nakamura, H., Masutani, H., Yodoi, J., Uchida, K. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 26046–26054.
39. Ren, X., Bjornstedt, M., Shen, B., Ericson, M.L., Holmgren, A. (1993) *Biochemistry*, **32**, 9701–9708.
40. Lee, K., Murakawa, M., Takahashi, S., Tsubuki, S., Kawashima, S., Sakamaki, K., Yonehara, S. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 19160–19166.
41. Holmgren, A., Fagerstedt, M. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 6926–6930.
42. Fernando, M.R., Nanri, H., Yoshitake, S., Nagata-Kuno, K. Minakami, S. (1992) *Eur. J. Biochem.*, **209**, 917–922.
43. Das, K.C., Lewis-Molock, Y., White, C.W. (1997) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **17**, 713–726.
44. Das, K.C., Guo, X.L., White, C.W. (1999) *Am. J. Physiol.*, **276**, L530–L539.
45. Nkabyo, Y.S., Ziegler, T.R., Gu, L.H., Watson, W.H., Jones, D.P. (2002) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **283**, G1352–G1359.
46. Watson, W.H., Jones, D.P. (2003) *FEBS Lett.*, **543**, 144–147.
47. Sasada, T., Iwata, S., Sato, N., Kitaoka, Y., Hirota, K., Nakamura, K., Nishiyama, A., Taniguchi, Y., Takabayashi, A., Yodoi, J. (1996) *J. Clin. Invest.*, **97**, 2268–2276.
48. Andoh, T., Chock, P.B., Chiueh, C.C. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 9655–9660.
49. Gon, Y., Sasada, T., Matsui, M., Hashimoto, S., Takagi, Y., Iwata, S., Wada, H., Horie, T., Yodoi, J. (2001) *Life Sci.*, **68**, 1877–1888.
50. Shioji, K., Kishimoto, C., Nakamura, H., Masutani, H., Yuan, Z., Oka, S.-I., Yodoi, J. (2002) *Circulation*, **106**, 1403–1409.
51. Tanaka, T., Nakamura, H., Nishiyama, A., Hosoi, F., Masutani, H., Wada, H., Yodoi, J. (2000) *Free Radic. Res.*, **33**, 851–855.
52. Rhee, S.G., Kang, S.W., Chang, T.-S., Jeong, W., Kim, K. (2001) *IUBMB Life*, **52**, 35–41.
53. Norberg, J., Arner, E.S.J. (2001) *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 1287–1312.
54. Das, K.C., Das, C.K. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **277**, 443–447.
55. Arner, E.S.J., Holmgren, A. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6102–6109.
56. Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J., Taketa, M.M. (1996) *Develop. Biol.*, **178**, 179–185.
57. Nonn, L., Williams, R.R., Erickson, R.P., Powis, G. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 916–922.
58. Park, J., Churchich, J.E. (1992) *FEBS Lett.*, **310**, P. 1–4.
59. Bodenstein, J., Follmann, H. (1991) *Zeitschrift für Naturforschung Sec. C Biosci.*, **46**, 270–279.
60. Pedrajas, J.R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J.A., Spyrou, G. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 16296–16301.
61. Reddy, P.G., Bhuyan, D.K., Bhuyan, K.C. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **265**, 345–349.
62. Holmgren, A., Bjornstedt, M. (1995) *Methods Enzymol.*, **252**, 199–208.
63. Nakamura, H., Masutani, H., Yodoi, J. (2002) *Antioxid. Redox Signal.*, **4**, 455–464.
64. Miyamoto, S., Kawano, H., Sakamoto, T., Soejima, H., Kajiwara, I., Hokamaki, J., Hirai, N., Sugiyama, S., Yoshimura, M., Yasue, H., Nakamura, H., Yodoi, J., Ogawa, H. (2004) *Antioxid. Redox Signal.*, **6**, 75–80.
65. Miyamoto, S., Kawano, H., Takazoe, K., Soejima, H., Sakamoto, T., Hokamaki, J., Yoshimura, M., Nakamura, H., Yodoi, J., Ogawa, H. (2004) *Thromb. Res.*, **113**, 345–351.

66. Rundlof, A.K., Arner, E.S.J. (2004) *Antioxid. Redox Signal.*, **6**, 41–52.
67. Mitsui, A., Hamuro, J., Nakamura, H., Kondo, N., Hirabayashi, Y., Ishizaki-Koizumi, S., Hirakawa, T., Inoue, T., Yodoi, J. (2002) *Antioxid. Redox Signal.*, **4**, 693–696.
68. Takagi, Y., Mitsui, A., Nishiyama, A., Nozaki, K., Sono, H., Gon, Y., Hashimoto, N., Yodoi, J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4131–4136.
69. Hoshino, T., Nakamura, H., Okamoto, M., Kato, S., Araya, S., Nomiyama, K., Oizumi, K., Young, H.A., Aizawa, H., Yodoi, J. (2003) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **168**, 1075–1083.
70. Nakamura, H., Tamura, S., Watanabe, I., Iwasaki, T., Yodoi, J. (2002) *Immunol. Lett.*, **82**, 165–170.
71. Kasuno, K., Nakamura, H., Ono, T., Muso, E., Yodoi, J. (2003) *Kidney Int.*, **64**, 1273–1282.
72. Das, K.C. (2004) *Antioxid. Redox Signal.*, **6**, 177–184.
73. Kondo, N., Ishii, Y., Kwon, Y.W., Tanito, M., Horita, H., Nishinaka, Y., Nakamura, H., Yodoi, J. (2004) *J. Immunol.*, **172**, 442–448.
74. Lowenstein, C.J. (2004) *Circulation*, **110**, 1178–1179.
75. Hattori, I., Takagi, Y., Nakamura, H., Nozaki, K., Bai, J., Kondo, N., Sugino, T., Nishimura, M., Hashimoto, N., Yodoi, J. (2004) *Antioxid. Redox Signal.*, **6**, 81–87.
76. Tanito, M., Nakamura, H., Kwon, Y.W., Teratani, A., Masutani, H., Shioji, K., Kishimoto, C., Ohira, A., Horie, R., Yodoi, J. (2004) *Antioxid. Redox Signal.*, **6**, 89–97.
77. Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., Orrenius, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1259–1263.
78. Ly, J.D., Grubb, D.R., Lawen, A. (2003) *Apoptosis*, **8**, 115–128.
79. Tanaka, T., Hosoi, F., Yamaguchi-Iwai, Y., Nakamura, H., Masutani, H., Ueda, S., Nishiyama, A., Takeda, S., Wada, H., Spyrou, G., Yodoi, J. (2002) *EMBO J.*, **21**, 1695–1703.
80. Wang, X. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 2922–2933.
81. Ueda, S., Nakamura, H., Masutani, H., Sasada, T., Yonehara, S., Takabayashi, A., Yamaoka, Y., Yodoi, J. (1998) *J. Immunol.*, **161**, 6689–6695.
82. Grogan, T.M., Fenoglio-Prieser, C., Zeheb, R., Bellamy, W., Frutiger, Y., Vela, E., Stemmerman, G., Macdonald, J., Richter, L., Gallegos, A., Powis, G. (2000) *Hum. Pathol.*, **31**, 475–481.
83. Freemerman, A.J., Powis, G. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **274**, 136–141.
84. Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, H., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., Ichijo, H. (1998) *EMBO J.*, **17**, 2596–2606.
85. Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K.-I., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., Ichijo, H. (2001) *EMBO Rep.*, **2**, 222–228.
86. Davis, R.J. (1994) *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 470–473.
87. Waskiewicz, A.J., Cooper, J.A. (1995) *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **7**, 798–805.
88. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. (1999) *Physiol. Rev.*, **79**, 143–180.
89. Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., Dijke, P.T., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., Gotoh, Y. (1997) *Science*, **275**, 90–94.
90. Tobiume, K., Inage, T., Takeda, K., Enomoto, S., Miyazono, K., Ichijo, H. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **239**, 905–910.
91. Geleziunas, R., Xu, W., Takeda, K., Ichijo, H., Greene, W.C. (2001) *Nature*, **410**, 834–838.

92. Sumbayev, V.V. (2003) Arch. Biochem. Biophys., **415**, 133–136.
93. Liu, Y., Min, W. (2002) Circ. Res., **90**, 1259–1266.
94. Qin, J., Clore, G.M., Kennedy, W.M., Huth, J.R., Gronenborn, A.M. (1995) Structure, **3**, 289–297.
95. Wang, P.F., Veine, D.M., Ahn, S.H., Williams, C.H.Jr. (1996) Biochemistry, **35**, 4812–4819.
96. Nishiyama, A., Masutani, H., Nakamura, H., Nishinaka, Y., Yodoi, J. (2001) IUBMB Life, **52**, 29–33.
97. Allen, R.G. (1998) Age, **21**, 47–76.
98. Gabbita, S.P., Robinson, K.A., Stewart, C.A., Foyd, R.A., Hensley, K. (2000) Arch. Biochem. Biophys., **376**, 1–13.
99. Forman, H.J., Torres, M., Fukuto, J. (2002) Mol. Cell. Biochem., **234/235**, 49–62.
100. Haddad, J.J. (2002) Cell. Signal., **14**, 879–897.
101. Aggarwal, B.B. (2000) Biochem. Pharmacol., **60**, 1033–1039.
102. Grippo, J.F., Holmgren, A., Pratt, W.B. (1985) J. Biol. Chem., **260**, 93–97.
103. Hayashi, S., Hajiro-Nakanishi, K., Makino, Y., Eguchi, H., Yodoi, J., Tanaka, H. (1997) Nucleic Acids Res., **25**, 4035–4040.
104. Kim, Y.-C., Yamaguchi, Y., Kondo, N., Masutani, H., Yodoi, J. (2003) Oncogene, **22**, 1860–1865.
105. Shaulian, E., Karin, M. (2002) Nature Cell Biol., **4**, E131–E136.
106. Sheikh, M.S., Formace, A.J. (2000) J. Cell. Physiol., **182**, 171–181.
107. Floher, L., Brigelius-Floher, R., Saliou C., Traber, M.G., Packer, L. (1997) Free Radic. Biol. Med., **22**, 1115–1126.
108. Rupec, R.A., Baeurle, P.A. (1995) Eur. J. Biochem., **234**, 632–640.
109. Das, K.C. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 4662–4670.
110. Hirano, M., Osada, S., Aoki, T., Hirai, S., Hosaka, M., Inoue, J., Ohno, S. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 13234–13238.
111. Stewart, Z.A., Pietenpol, J.A. (2001) Chem. Res. Toxicol., **14**, 243–263.
112. Hainaut, P., Mann, K. (2001) Antiox. Redox Signal., **3**, 611–623.
113. Nguyen, T., Huang, H.C., Pickett, C.B. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 15466–15473.
114. Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 11908–11913.
115. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. (2006) Биохимия, **71**, 1183–1197.
116. Tanito, M., Masutani, H., Nakamura, H., Oka, S., Ohira, A., Yodoi, J. (2002) Neurosci. Lett., **326**, 142–146.
117. Srivastava, S., Watowich, S.J., Petrash, J.M., Srivastava, S.K., Bhatnagar, A. (1999) Biochemistry, **38**, 42–54.
118. Uchida, K., Kanematsu, M., Sakai, K., Matsuda, T., Hattori, N., Mizuno, Y., Suzuki, D., Miyata, T., Noguchi, N., Niki, E., Osawa, T. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 4882–4887.
119. Anderson, M.M., Hazen, S.L., Hsu, F.F., Heinecke, J.W. (1997) J. Clin. Invest., **99**, 424–432.
120. Ghilarducci, D.P., Tjeerdema, R.S. (1995) Rev. Environ. Contam. Toxicol., **144**, 95–146.
121. Horton, N.D., Mamiya, B.M., Kehrer, J.P. (1997) Toxicology, **122**, 111–122.
122. Ramu, K., Perry, C.S., Ahme, T., Pakenham, G., Kehrer, J.P. (1996) Toxicol. Appl. Pharmacol., **140**, 487–498.
123. Kehrer, J.P., Biswal, S.S. (2000) Toxicol. Sci., **57**, 6–15.

124. Horton, N.D., Biswal, S.S., Corrigan, L.L., Bratta, J., Kehrer, J.P. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 9200–9206.
125. Watson, W.H., Yang, X., Choi, Y.E., Jones, D.P., Kehrer, J.P. (2004) *Toxicol. Sci.*, **78**, 3–14.
126. Li, L., Hamilton, R.F., Holian, A. (1999) *Am. J. Physiol.*, **277**, L550–L557.
127. Kumar, S., Rabson, A.B., Gelinas, C. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 3094–3106.
128. Biswal, S., Acquah-Mensah, G., Datta, K., Wu, X., Kehrer, J.P. (2002) *Chem. Res. Toxicol.*, **15**, 180–186.
129. Biswal, S., Maxwell, T., Rangasamy, T., Kehrer, J.P. (2003) *Carcinogenesis*, **24**, 1401–1406.
130. Holmgren, A. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 13963–13966.
131. Gromer, S., Schirmer, R.H., Becker, K. (1999) *Redox Rep.*, **4**, 221–228.
132. Holmgren, A. (2000) *Antioxid. Redox Signal.*, **2**, 811–820.
133. Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A.E., Spyrou, G. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1447**, 113–118.
134. Sun, Q.A., Wu, Y., Zappacosta, F., Jeang, K.T., Lee, B.J., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 24522–24530.
135. Sun, Q.A., Kirnarsky, L., Sherman, S., Gladyshev, V.N. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3673–3678.
136. Rundlof, A.K., Carlsten, M., Giacobini, M.M., Arner, E.S. (2000) *Biochem. J.*, **347**, 661–668.
137. Sun, Q.A., Zappacosta, F., Factor, V.M., Wirth, P.J., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 3106–3114.
138. Kanzok, S.M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J.K., Muller, H.M., Botella-Munoz, J., Schnewly, S., Schirmer, R., Becker, K. (2001) *Science*, **291**, 643–646.
139. Holmgren, A. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 4600–4606.
140. Gladyshev, V.N., Jeang, K.T., Stadtman, T.C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6146–6151.
141. Zhong, L., Arner, E.S.J., Ljung, J., Aslund, F., Holmgren, A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 8581–8591.
142. Lee, S.R., Bar-Noy, S., Kwon, J., Levine, R.L., Stadtman, T.C., Rhee, S.G. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2521–2526.
143. Zhong, L., Arner, E.S.J., Holmgren, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5854–5859.
144. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. (2006) Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. Фирма «Слово», Москва, 553с.
145. Hill, K.E., McCollum, G.W., Boeglin, M.E., Burk, R.F. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 293–295.
146. Marcocci, L., Flohe, L., Packer, L. (1997) *Biofactors*, **6**, 351–358.
147. Berggren, M., Gallegos, A., Gaskaska, J., Powis, G. (1999) *Anticancer Res.*, **17**, 3377–3380.
148. Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A., Schneider, G. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9533–9538.
149. Arscott, L.D., Gromer, S., Schirmer, R.H., Becker, K., Williams, C.H.Jr. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3621–3626.
150. Williams, C.H. (1992) *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*. Eds. F. Muller. Boca Raton. FL: CRC Inc., **3**, 121–211.
151. Gromer, S., Wissing, J., Behne, D., Ashman, K., Schirmer, R.H., Flohe, L., Becker, K. (1998) *Biochem. J.*, **332**, 591–592.
152. Nordberg, J., Zhong, L., Holmgren, A., Arner, E.S.J. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 10835–10842.

153. Kanzok, S.M., Schirmer, R.H., Turbachova, I., Iozef, R., Becker, K. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 40180–40186.
154. Ferrari, D.M., Soling, H.D. (1999) *Biochem. J.*, **339**, 1–10.
155. Lundstrom, J., Holmgren, A. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 9114–9120.
156. Lundstrom-Ljung, J., Birnbach, U., Rupp, K., Soling, H.D., Holmgren, A. (1995) *FEBS Lett.*, **357**, 305–308.
157. Andersson, M., Holmgren, A., Spyrou, G. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 10116–10120.
158. Holmgren, A., Lyckeberg, C. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5149–5152.
159. Luthman, M., Holmgren, A. (1982) *Biochemistry*, **21**, 6628–6633.
160. Buettner, G.R. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 535–543.
161. Chopra, M., Thurnham, D.I. (1999) *Proc. Nutr. Soc.*, **58**, 663–671.
162. May, J.M., Mendiratta, S., Qu, Z.C., Loggins, E. (1999) *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 1513–1523.
163. Tamura, T., Gladyshev, V., Liu, S.Y., Stadtman, T.C. (1995–1996) *Biofactors*, **5**, 99–102.
164. Packer, L., Witt, E.H., Tritschler, H.J. (1995) *Free Radic. Biol. Med.*, **19**, 227–250.
165. Kagan, V.E., Shvedova, A., Serbinova, E., Khan, S., Swanson, C., Powell, R., Packer, L. (1992) *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 1637–1649.
166. Teichert, J., Preiss, R. (1992) *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **30**, 511–512.
167. Constantinescu, A., Pick, U., Handelman, G.J., Haramaki, N., Han, D., Podda, M., Tritschler, H.J., Packer, L. (1995) *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 253–261.
168. Pick, U., Haramaki, N., Constantinescu, A., Handelman, G.J., Tritschler, H.J., Packer, L. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206**, 724–730.
169. Kumar, S., Bjornstedt, M., Holmgren, A. (1992) *Eur. J. Biochem.*, **207**, 435–439.
170. Bjornstedt, M., Xue, J., Huang, W., Akesson, B., Holmgren, A. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 29382–29384.
171. Ganther, H.E. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4089–4098.
172. Bjornstedt, M., Kumar, S., Holmgren, A. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 8030–8034.
173. Bjornstedt, M., Kumar, S., Bjorkhem, L., Spyrou, G., Holmgren, A. (1997) *Biomed. Environ. Sci.*, **10**, 271–279.
174. Manevich, Y., Fisher, A.B. (2005) *Free Radic. Biol. Med.*, **38**, 1422–1432.
175. Fujii, J., Ikeda, Y. (2002) *Redox Rep.*, **7**, 123–130.
176. Manevich, Y., Feinstein, S., Fisher, A.B. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3780–3785.
177. Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) *Physiol. Rev.*, **59**, 527–605.
178. Scandalios, J.G., Guan, L., Polidoros, A.N. (1997) *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Eds. J.G. Scandalios. Cold Spring Harbor. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 343–406.
179. Moore, R.B., Mankad, M.V., Shriver, S.K., Mankad, V.N., Plishker, G.A. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 18964–18968.
180. Neumann, C.A., Krause, D.S., Carman, C.V., Das, S., Dubey, D.P., Abraham, J.L., Bronson, R.T., Fujiwara, Y., Orkin, S.H., VanEtten, R.A. (2003) *Nature*, **424**, 561–565.
181. Lee, T.H., Kim, S.U., Yu, S.L., Kim, S.H., Park, D.S., Moon, H.B., Dho, S.H., Kwon, K.S., Kwon, H.J., Han, Y.H., Jeong, S., Kang, S.W., Shin, H.S., Lee, K.K., Rhee, S.G., Yu, D.Y. (2003) *Blood*, **101**, 5033–5038.
182. Wang, X., Phelan, S.A., Forsman-Semb, K., Taylor, E.F., Petros, C.,

- Brown, A., Lerner, C.P., Paigen, B. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 25179–25190.
183. Rhee, S.G., Chang, T.S., Bae, Y.S., Lee, S.R., Kang, S.W. (2003) *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, S211–S215.
184. Thannickal, V.J., Fanburg, B.L. (2000) *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **279**, L1005–L1028.
185. Kang, S.W., Chae, H.Z., Seo, M.S., Kim, K., Baines, I.C., Rhee, S.G. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 6297–6302.
186. Kang, S.W., Chang, T.S., Lee, T.H., Kim, E.S., Yu, D.Y., Rhee, S.G. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 2535–2543.
187. Shau, H., Huang, A.C., Faris, M., Nazarian, R., DeVellis, J., Chen, W. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**, 683–686.
188. Kim, H., Lee, T.H., Park, E.S., Suh, J.M., Park, S.J., Chung, H.K., Kwon, O.Y., Kim, Y.K., Ro, H.K., Shong, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 18266–18270.
189. Wood, Z.A., Poole, L.B., Karplus, P.A. (2003) *Science*, **300**, 650–653.
190. Jin, D.Y., Chae, H.Z., Rhee, S.G., Jeang, K.T. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 30952–30961.
191. Li, B., Ishii, T., Tan, C.P., Soh, J.W., Goff, S.P. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 12418–12422.
192. Chang, J.W., Jeon, H.B., Lee, J.H., Yoo, J.S., Chun, J.S., Kim, J.H., Yoo, Y.J. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 507–512.
193. Mizusawa, H., Ishii, T., Bannai, S. (2000) *Neurosci. Lett.*, **283**, 57–60.
194. Lee, S.C., Chae, H.Z., Lee, J.E., Kwon, B.D., Lee, J.B., Won, Y.H., Ahn, K.Y., Kim, Y.P. (2000) *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 1108–1114.
195. Bast, A., Wolf, G., Oberbaumer, I., Walther, R. (2002) *Diabetologia*, **45**, 867–876.
196. Kinnula, V.L., Lehtonen, S., Kaartee-naho-Wiik, R., Lakari, E., Paakko, P., Kang, S.W., Rhee, S.G., Soini, Y. (2002) *Thorax*, **57**, 157–164.
197. Novoselov, S.V., Peshenko, I.V., Popov, V.I., Novoselov, V.I., Bystrova, M.F., Evdokimov, V.J., Kamzalo, S.S., Merkulova, M.I., Shuvaeva, T.M., Lipkin, V.M., Fesenko, E.E. (1999) *Cell Tissue Res.*, **298**, 471–480.
198. Chuchalin, A.G., Novoselov, V.I., Shifrina, O.N., Soodaeva, S.K., Yanin, V.A., Barishnikova, L.M. (2003) *Respir. Med.*, **97**, 147–151.
199. Immenschuh, S., Baumgart-Vogt, E., Tan, M., Iwahara, S., Ramadori, G., Fahimi, H.D. (2003) *J. Histochem. Cytochem.*, **51**, 1621–1631.
200. Banmeyer, I., Marchand, C., Verhaeghe, C., Vucic, B., Rees, J.F., Knoops, B. (2004) *Free Radic. Biol. Med.*, **36**, 65–77.
201. Seo, M.S., Kang, S.W., Kim, K., Baines, I.C., Lee, T.H., Rhee, S.G. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 20346–20354.
202. Ishii, T., Yamada, M., Sato, H., Matsue, M., Taketani, S., Nakayama, K., Sugita, Y., Bannai, S. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 18633–18636.
203. Immenschuh, S., Baumgart-Vogt, E. (2005) *Antioxid. Redox Signal.*, **7**, 768–777.
204. Immenschuh, S., Iwahara, S.-I., Satoh, H., Nell, C., Katz N., Muller-Eberhard, U. (1995) *Biochemistry*, **34**, 13407–13411.
205. Maines, M.D. (1997) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **37**, 517–554.
206. Otterbein, L.E., Choi, A.M. (2000) *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **279**, L1029–L1037.
207. Siow, R.C.M., Ishii, T., Sato, H., Taketani, S., Leake, D.S., Sweiry, J.H., Pearson, J.D., Bannai, S., Mann, G.E. (1995) *FEBS Lett.*, **368**, 239–242.

208. Nakaso, K., Kitayama, M., Mizuta, E., Fukuda, H., Ishii, T., Nakashima, K., Yamada, K. (2000) *Neurosci. Lett.*, **293**, 49–52.
209. Kim, H.S., Manevich, Y., Feinstein, S.I., Pak, J.H., Ho, Y.S., Fisher, A.B. (2003) *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **285**, L363–L369.
210. Nguyen, T., Sherratt, P.J., Pickett, C.B. (2003) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **43**, 233–260.
211. Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S., Yamamoto, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 16023–16029.
212. Hess, A., Wijayanti, N., Neuschaefer-Rube, A.P., Katz, N., Kietzmann, T., Immenschuh, S. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 45419–45434.
213. Gopalakrishna, R., Jaken, S. (2000) *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1349–1361.
214. Nishizuka, Y. (1992) *Science*, **258**, 7–614.
215. Immenschuh, S., Stritzke, J., Iwahara, S.-I., Ramadori, G. (1999) *Hepatology*, **30**, 118–127.
216. Chang, T.S., Jeong, W., Choi, S.Y., Yu, S., Kang, S.W., Rhee, S.G. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 25370–25376.
217. Reynolds, C.M., Meyer, J., Poole, L.B. (2002) *Biochemistry*, **41**, 1990–2001.
218. Koo, K.H., Lee, S., Jeong, S.Y., Kim, E.T., Kim, H.J., Kim, K., Song, K., Chae, H.Z. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.*, **397**, 312–318.
219. Iwahara, S., Satoh, H., Song, D.-X., Webb, J., Burlingame, A.L., Nagae, Y., Muller-Eberhard, U. (1995) *Biochemistry*, **34**, 13398–13406.
220. Ishii, T., Kawane, T., Taketani, S., Bannai, S. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **216**, 970–975.
221. Lee, S.P., Hwang, Y.S., Kim, Y.J., Kwon, K.S., Kim, H.J., Kim, K., Chae, H.Z. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 29826–29832.
222. Sauer, H., Wartenberg, M., Hescheler, J. (2001) *Cell. Physiol. Biochem.*, **11**, 173–186.
223. Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K., Paules, R.S. (2000) *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1387–1404.
224. Oberley, T.D. (2002) *Am. J. Pathol.*, **160**, 403–408.
225. Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., SolloTT, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997) *Science*, **275**, 1649–1652.
226. Li, N., Oberley, T.D. (1998) *J. Cell. Physiol.*, **177**, 148–160.
227. Prosperi, M.T., Ferbus, D., Karczynski, I., Goubin, G. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 11050–11056.
228. Wen, S.-T., VanEtten, R.A. (1997) *Genes Dev.*, **11**, 2456–2467.
229. Mu, Z.M., Yin, X.Y., Prochownik, E.V. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 43175–43184.
230. Gu, L., Zheng, H., Murray, S.A., Ying, H., Xiao, Z.X.J. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 384–391.
231. Chen, G., Goeddel, D.V. (2002) *Science*, **296**, 1634–1635.
232. Schreck, R., Rieber, P., Baeuerle, P.A. (1991) *EMBO J.*, **10**, 2247–2258.
233. Zhang, P., Liu, B., Kang, S.W., Seo, M.S., Rhee, S.G., Obeid, L.M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 30615–30618.
234. Chu, S.H., Lee-Kang, J., Lee, K.H., Lee, K. (2003) *Pharmacology*, **69**, 12–19.
235. Kim, Y.J., Lee, W.S., Ip, G., Chae, H.Z., Park, E.M., Park, Y.M. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 7136–7142.
236. Bushweller, J.H., Billeter, M., Holmgren, A., Wuthrich, K. (1994) *J. Mol. Biol.*, **235**, 1585–1597.
237. Nordstrand, K., Aslund, F., Holmgren, A., Otting, G., Berndt, K.D. (1999) *J. Mol. Biol.*, **286**, 541–552.

238. *Schafer, F.Q., Buettner, G.R.* (2001) *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 238–239.
239. *Daily, D., Vlamis-Gardikas, A., Offen, D., Mittelmann, L., Melamed, E., Holmgren, A., Barzilai, A.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 21618–21626.
240. *Klatt, P., Pineda-Molina, E., DeLa-coba, M.G., Padilla, A.C., Marti-nez-Galisteo, E., Barzena, J.A., Lamas, S.* (1999) *FASEB J.*, **13**, 1481–1490.
241. *Tew, K.D.* (2007) *Biochem. Pharma-col.*, **73**, 1257–1269.
242. *Kallis, G.B., Holmgren, A.* (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 10261–10265.
243. *Holmgren, A., Luthman, M.* (1978) *Biochemistry*, **17**, 4071–4077.
244. *Martin, J.L.* (1995) *Structure*, **3**, 245–250.
245. *Barrett, W.C., DeGnove, J.P., Konig, S., Fales, H.M., Keng, Y.F., Zhang, Z.Y., Yim, M.B., Chock, P.B.* (1999) *Biochemistry*, **38**, 6699–6705.
246. *Borges, C.R., Geddes, T.J., Watson, J.T., Kuhn, D.M.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 48295–48302.
247. *Nulton-Persson, A.C., Starke, D.W., Mieyal, J.J., Szweda, L.I.* (2003) *Biochemistry*, **42**, 4235–4242.
248. *Rao, R.K., Clayton, L.W.* (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 610–616.
249. *Wang, J., Boja, E.S., Tan, W., Tekle, E., Fales, H.M., English, S., Mieyal, J.J., Chock, P.B.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 47763–47766.
250. *Wang, J., Tekle, E., Oubrahim, H., Mieyal, J.J., Stadtman, E.R., Chock, P.B.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5103–5106.
251. *Gravina, S.A., Mieyal, J.J.* (1993) *Biochemistry*, **32**, 3368–3376.
252. *Yoshitake, S., Nanri, H., Fernando, M.R., Minakami, S.* (1994) *J. Bio-chem.*, **116**, 42–46.
253. *Ruoppolo, M., Lundstrom-Ljung, J., Talamo, F., Pucci, P., Mari-no, G.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 12259–12267.
254. *Lundberg, M., Johansson, C., Chan-dra, J., Enoksson, M., Jacobsson, G., Ljung, J., Johansson, M., Holm-gren, A.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 26269–26275.
255. *Wingert, R.A., Galloway, J.L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J.L., Weber, G.J., Dooley, K., Davidson, A.J., Schmid, B., Paw, B.H., Shaw, G.C., Kingsley, P., Palis, J., Schubert H., Chen, O., Kaplan, J., Zon, L.I.* (2005) *Nature*, **436**, 1035–1039.
256. *Lysell, J., Vladic, Y.S., Ciarlo, N., Holmgren, A., Sahlin, L.* (2003) *Gy-necol. Endocrinol.*, **17**, 303–310.
257. *Holmgren, A.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2275–2279.
258. *Holmgren, A.* (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 3664–3671.
259. *Holmgren, A., Ohlsson, I., Grankvist, M.L.* (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 430–436.
260. *Pineda-Molina, E., Klatt, P., Vazquez, J., Marina, A., de Lacoba, M.G., Perez-Sala, D., Lamas, S.* (2001) *Biochemistry*, **40**, 14134–14142.
261. *Takashima, Y., Hirota, K., Nakamura, H., Nakamura, T., Akiyama, K., Cheng, F.S., Maeda, M., Yodoi, J.* (1999) *Immunol. Lett.*, **68**, 397–401.
262. *Bandyopadhyay, S., Starke, D.W., Mieyal, J.J., Gronostajski, R.M.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 392–397.
263. *Hirota, K., Matsui, M., Murata, M., Takashima, Y., Cheng, F.S., Itoh, T., Fukuda, K., Yodoi, J.* (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **274**, 177–182.
264. *Nakamura, T., Ohno, T., Hirota, K., Nishiyama, A., Nakamura, H., Wada, H., Yodoi, J.* (1999) *Free Radic. Res.*, **31**, 357–365.
265. *Chrestensen, C.A., Starke, D.W., Mieyal, J.J.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 26556–26565.
266. *Daily, D., Vlamis-Gardikas, A., Offen, D., Mittelmann, L., Melamed, E., Holmgren, A., Barzilai, A.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 1335–1344.

267. Davis, D.A., Newcomb, F.M., Starke, D.W., Ott, D.E., Mieyal, J.J., Yarchoan, R. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 25935–25940.
268. Lind, C., Gerdes, R., Schuppe-Koistinen, I., Cotgreave, I.A. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 481–486.
269. Nakamura, H., Bai, J., Nishinaka, Y., Ueda, S., Sasada, T., Ohshio, G., Imamura, M., Takabayashi, A., Yamaoka, Y., Yodoi, J. (2000) *Cancer Detect. Prev.*, **24**, 53–60.
270. Gladyshev, V.N., Liu, A., Novoselov, S.V., Krysan, K., Sun, Q.A., Kryukov, V.M., Kryukov, G.V., Lou, M.F. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 30374–30380.
271. Johansson, C., Lillig, C.H., Holmgren, A. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 7537–7543.
272. Beer, S.M., Taylor, E.R., Brown, S.E., Dahm, C.C., Costa, N.J., Runswick, M.J., Murphy, M.P. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 47939–47951.
273. Taylor, E.R., Hurrell, F., Shannon, R.J., Lin, T.K., Hirst, J., Murphy, M.P. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 19603–19611.
274. Holmgren, A. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 3672–3678.
275. Lillig, C.H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lonn, M.E., Hudemann, C., Bill, E., Holmgren, A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8168–8173.
276. Berndt, C., Hudemann, C., Hanschmann, E.M., Axelsson, R., Holmgren, A., Lillig, C.H. (2007) *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 151–157.
277. Soderdahl, T., Enoksson, M., Lundberg, M., Holmgren, A., Ottersen, O.P., Orrenius, S., Bolcsfoldi, G., Cotgreave, I.A. (2003) *FASEB J.*, **17**, 124–126.
278. Lillig, C.H., Lonn, M.E., Enoksson, M., Fernandes, A.P., Holmgren, A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13227–13232.
279. Enoksson, M., Fernandes, A.P., Prast, S., Lillig, C.H., Holmgren, A., Orrenius, S. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**, 774–779.
280. Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lonn, M.E., Hudemann, C., Lillig, C.H. (2005) *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 1375–1377.
281. Rodriguez-Manzanique, M.T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., Herrero, E. (2002) *Mol. Biol. Cell*, **13**, 1109–1121.
282. Fernandes, A.P., Fladvad, M., Berndt, C., Andresen, C., Lillig, C.H., Neubauer, P., Sunnerhagen, M., Holmgren, A., Vlamis-Gardikas, A. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 24544–24552.
283. Muhlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., Lill, R. (2003) *EMBO J.*, **22**, 4815–4825.
284. Molina-Navarro, M.M., Casas, C., Piedrafita, L., Belli, G., Herrero, E. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 2273–2280.
285. Tamarit, J., Belli, G., Cabisco, E., Herrero, E., Ros, J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 25745–25751.
286. Xia, B., Vlamis-Gardikas, A., Holmgren, A., Wright, P.E., Dyson, H.J. (2001) *J. Mol. Biol.*, **310**, 907–918.
287. Berndt, C., Lillig, C.H., Holmgren, A. (2007) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **292**, H1227–H1236.
288. Okuda, M., Inoue, N., Azumi, H., Seno, T., Sumi, Y., Hirata, K.I., Kawashima, S., Hayashi, Y., Itoh, H., Yodoi, J., Yokoyama, M. (2001) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 1483–1487.
289. Nakamura, H., Vaage, J., Valen, G., Padilla, C.A., Bjornstedt, M., Holmgren, A. (1998) *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 1176–1186.
290. Lundberg, M., Fernandes, A.P., Kumar, S., Holmgren, A. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319**, 801–809.
291. Adachi, T., Pimentel, D.R., Heibeck, T., Hou, X., Lee, Y.J., Jiang, B., Ido, Y., Cohen, R.A. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 29857–29862.

292. *Berry-Lane, P.A., Patterson, C., VanDerMerwe, M., Hu, Z., Holland, S.M., Yeh, E.T.H., Runge, M.S.* (2001) *J. Clin. Invest.*, **108**, 1513–1522.
293. *Dong, M, Feng, F.Y., Lin, C., Zhang, X.Y., Fu, M., Liang, X., Zha, Y.Y., Lu, H.Y., Wu, M.* (2004) *Zhonghua Yi Xie Za Zhi*, **84**, 323–328.
294. *Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Сап-рин А.Н., Котова Я.Н., Гаврилова Ю.А., Чермных Н.С., Щербак Н.П.* (2007) *Бюл. эксп. биол. мед.*, **144**, 274–276.
295. *Kalinina, E.V., Novichkova, M.D., Scherbak, N.P., Solomka, V.S., Sap-рин, A.N.* (2001) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **500**, 241–244.