

РОЛЬ ГЛУТАТИОНА, ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗЫ И ГЛУТАРЕДОКСИНА В РЕГУЛЯЦИИ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ

©2014 г. Е. В. КАЛИНИНА, Н. Н. ЧЕРНОВ,
М. Д. НОВИЧКОВА

Российский университет дружбы народов (РУДН), Москва

I. Введение. II. Глутатион. Строение, редокс-зависимые функции.
III. Роль глутатион S-трансферазы в редокс-зависимых процессах.
IV. Глутаредоксин. Роль в редокс-зависимой регуляции. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Важную роль для жизнеспособности клетки играет контроль метаболизма и процессов развития, в значительной степени осуществляемый за счет тиол-дисульфидного обмена. SH-группы остатков цистеина весьма значимы для функционирования ферментов и процессов, лежащих в основе ответов на факторы окружающей среды и внутриклеточной передачи информации – клеточного сигналинга. Базовым механизмом центральной роли тиол-опосредованного окислительно-восстановительного (редокс) контроля в клеточном метаболизме

Принятые сокращения: АФА – активные формы азота, АФК – активные формы кислорода, АИФ – апоптоз-индуцирующий фактор, АМФК – серин/треониновая АМФ-активируемая протеинкиназа, ARE – антиоксидант-респонсивный элемент, ASK1 – регулирующая апоптотические сигналы киназа 1 (от англ. apoptosis signal-regulating kinase-1), BSO – бутионинсульфоксимин, ERK – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами (от англ. extracellular signal-regulated kinase), γ -GT – γ -глутамилтрансфераза, GPx – глутатионпероксидаза, Grx – глутаредоксин, GS – глутатионсинтетаза, GSH, GSSG – глутатион восстановленный, окисленный, γ -GSL – γ -глутамилцистеинлигаза, GST – глутатион S-трансфераза, JNK – c-Jun-N-концевая киназа (от англ. c-Jun N-terminal kinase), MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа, mGSH – митохондриальный глутатион, nGSH – ядерный глутатион, OGC – переносчик 2-оксиглутарата, ПОЛ – перекисное окисление липидов, PARP – поли(АДФ-рибоза)полимераза, Prx – перокси-редоксин, Trx – тиоредоксин, TrxR – тиоредоксинредуктаза.

Адрес для корреспонденции: kevsan@orc.ru

является способность тиольных групп обратимо изменять свое редокс-состояние с последующим изменением конформационных, каталитических или регуляторных функций белка. Основу клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза, с помощью которого может поддерживаться редокс-состояние тиольных групп белков, составляет отношение восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона, присутствующего в большинстве клеток в миллимолярной концентрации [1, 2].

Восстановленный глутатион (GSH) – трипептид, состоящий из аминокислот L-глутамата, L-цистеина и глицина, менее подвержен окислению в отличие от Cys, что делает его наиболее подходящим для поддержания внутриклеточного редокс-потенциала. Важное значение GSH в редокс-зависимых процессах определяется его участием в регуляции клеточного редокс-зависимого сигналинга и активности транскрипционных факторов, а также тем фактом, что он является внутриклеточным антиоксидантом, играя роль «ловушки» свободных радикалов, косубстрата в реакциях детоксикации пероксидов, катализируемых глутатионпероксидазой (GPx) и глутатионтрансферазой (GST), и выступает в качестве агента, восстанавливающего окисленный глутаредоксин (Grx), необходимый для восстановления дисульфидов [3–5]. Сохранение оптимального для клетки соотношения восстановленного глутатиона к окисленному (GSSG) – GSH/GSSG является важным условием для ее жизнеспособности. Снижение уровня GSH ниже показателей нормы может служить индикатором нарушения клеточного редокс-статуса и изменения редокс-зависимой регуляции генов. Нарушение внутриклеточного баланса GSH наблюдается при ряде патологий, включая злокачественные новообразования [6]. S-глутатионилирование белков является важным регуляторным механизмом в биохимических процессах благодаря обратимой модификации сульфгидрильных групп белков и может осуществляться как неферментативным, так и ферментативным путем с участием GST и Grx [7].

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 GST и Grx в антиоксидантную защитную систему, что повышает устойчивость клеток к окислительному стрессу [8–10]. Существенным блоком развитию деструктивного действия окислительного стресса служит GST, обладающая высокой активностью по отношению к продуктам

перекисного окисления ДНК и липидов. Дисульфиды и смешанные дисульфиды являются субстратами Gtx, который играет важную роль в тиол-дисульфидном обмене, регулируя, в частности, активность транскрипционных факторов и процесс апоптоза. Изоформы GST и Gtx имеют большое значение в регуляции клеточного сигналинга путем белок-белковых взаимодействий с ключевыми киназами, контролирующими клеточный ответ на стресс, пролиферацию, развитие апоптоза.

Настоящий обзор представляет попытку обобщить данные последних лет о роли глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции клеточных редокс-зависимых процессов.

II. ГЛУТАТИОН. СТРОЕНИЕ, РЕДОКС-ЗАВИСИМЫЕ ФУНКЦИИ

СТРОЕНИЕ И СИНТЕЗ ГЛУТАТИОНА

Глутатион (γ -глутамил-цистеинил-глицин) – одно из основных внутриклеточных низкомолекулярных тиолсодержащих соединений, синтезирующихся почти во всех эукариотических клетках. Благодаря своему строению и высокой внутриклеточной концентрации (1–10 мМ, 10 мМ для клеток печени и различных типов злокачественных клеток) GSH выполняет антиоксидантные функции, участвует в поддержании клеточного редокс-статуса, в работе системы детоксикации, в синтезе эйкозаноидов, в регуляции многих механизмов клеточного сигналинга, в частности при регуляции клеточного цикла, экспрессии генов, апоптоза [6]. Глутатион присутствует в клетке в основном в восстановленной форме, тогда как количество GSSG не превышает 1% от его общего внутриклеточного содержания. Примерно 85–90% GSH находится в цитозоле, но некоторая его часть после синтеза в цитозоле оказывается в митохондриях, ядре, пероксисомах, эндоплазматическом ретикулуме [11]. Поддержание оптимального соотношения GSH/GSSG в клетке является существенным для нормального ее функционирования и выживания. Поэтому крайне важно строго контролировать систему, регулируемую данное соотношение. Недостаток GSH подвергает клетку риску окислительного повреждения. Установлено, что дисбаланс в регуляции GSH наблюдается при широком ряде патологий, таких как рак, нейродегенеративные заболевания, муковисцидоз, ВИЧ [6].

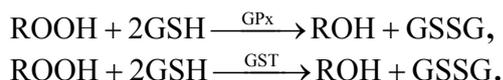
Синтез GSH *de novo* проходит в два АТФ-зависимых этапа, которые включены в цикл шести ферментативных реакций, получивших название γ -глутамильного цикла (рис. 1). Первый этап – реакция образования пептидной связи между цистеином и глутаминовой кислотой, которая катализируется γ -глутамилцистеинлигазой (γ -GCL) и является скоростью-лимитирующей реакцией в синтезе GSH. Второй этап – реакция, катализируемая глутатионсинтетазой (GS), приводящая к образованию GSH в результате связывания глицина с γ -глутамилцистеином [3]. Фермент, способный гидролизовать специфическую связь в молекуле GSH между остатками глутаминовой кислоты и цистеина, – γ -глутамилтрансфераза (γ -GT), локализован на внешней стороне цитоплазматической мембраны определенных типов клеток и обеспечивает перенос γ -глутамильного остатка на аминокислоту, делая возможным ее транспорт в клетку [3]. Образующийся в результате действия γ -GT дипептид цистеинилглицин расщепляется дипептидазой с образованием цистеина и глицина, которые становятся субстратами для γ -GCL и GS соответственно. γ -Глутамилциклотрансфераза обеспечивает разрыв связи γ -глутамильного остатка с аминокислотой с образованием свободной аминокислоты и 5-оксопролина, который под действием оксопролиназы дециклизуется, образуя глутаминовую кислоту, которая также становится субстратом для γ -GCL. Таким образом, внеклеточный глутатион может быть разрушен, входящие в его состав аминокислоты способны попасть внутрь клетки вновь, где опять возможно их включение в состав молекулы GSH. Большая часть содержания GSH плазмы крови обеспечивается его синтезом в печени, поэтому сбой этого процесса в данном органе ведут к системным межорганным нарушениям гомеостаза глутатиона [12].

Восполнение содержания GSH осуществляется не только за счет синтеза *de novo*, но и активности глутатионредуктазы (GR), которая восстанавливает GSSG в присутствии НАДФН(H^+) до GSH [3].

РОЛЬ ГЛУТАТИОНА В РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССАХ

Ключевым функциональным элементом в молекуле GSH является остаток цистеина, обеспечивающий наличие реакционноспособной тиольной группы. Среди функций, которые выполняет глутатион в клетке, в первую очередь надо отметить его участие в защите клеток от продуктов окислительного стресса. Пероксид водорода восстанавливается до воды глутатионпероксидазой с использованием GSH в качестве косубстрата. Восстановление органических гидроперекисей до соответствующих спиртов может осуществляться не только благодаря каталитической активности GPx, но и пероксидаз-

ной активности Se-независимой глутатион S-трансферазы, также использующей GSH в качестве косубстрата:



GSH служит для восстановления окисленной формы глутаредоксина, образующейся в результате восстановления дисульфидов [5].

Глутатион является низкомолекулярным антиоксидантом и может участвовать в неферментативной антиоксидантной защите, выступая эффективным скэвенджером («ловушкой») свободных радикалов [13, 14].

При развитии в клетке окислительного стресса наблюдается повреждение молекул углеводов, липидов, белков и нуклеиновых кислот, что приводит к нарушению функциональной способности и гибели клетки. Окислительный стресс и/или изменение клеточного редокс-статуса могут влиять на состояние ядерного хроматина и вызывать изменения экспрессии генов. Развитие окислительного стресса приводит к одно- и/или двухцепочечным разрывам ДНК. Вызываемые окислительным стрессом повреждения в митохондриях сопровождаются снижением трансмембранного потенциала, изменением проницаемости мембран и ускорением высвобождения апоптотических факторов, что приводит к гибели клеток [15]. При физиологических условиях активные формы кислорода (АФК) и активные формы азота (АФА) принимают важное участие в процессах редокс-сигналинга, которые являются, быстрыми, специфическими и обратимыми реакциями, регулирующими активность ключевых для жизнедеятельности клетки белков. Процессы, связанные с осуществлением редокс-сигналинга, могут протекать в различных областях клетки или компартментах в данный момент времени, вовлекая разные редокс-пары, как например, GSH/GSSG или НАДН(Н⁺)/НАД⁺ [16]. Особенное внимание уделяется в настоящее время изменениям в соотношении GSH/GSSG как основного показателя редокс-статуса и важного фактора сигнальной трансдукции [17].

Многие белки имеют в своем составе функционально значимые остатки цистеина, которые могут подвергаться посттрансляционной модификации, в том числе и окислению. При физиологических условиях свободная аминокислота цистеин имеет значение рК 8,5, при котором невозможны окислительные модификации. Находясь в составе белков, цистеин может быть активирован, т.е. переходить в состояние тиолат-аниона. Этому способствует множество факторов, в том числе водородные связи, действие соседних основных аминокислотных

остатков, микроокружение цистеиновых остатков, связывание с субстратом [18]. Между остатками цистеина белка и молекулы GSH может образоваться дисульфидная связь (белок-SSG). Такой процесс, получивший название S-глутатионилирования, позволяет защищать белки от окислительного стресса и вносит существенный вклад в осуществление редокс-сигналинга и регуляцию активности белков [19]. В результате реакции S-глутатионилирования может меняться способность белка формировать дисульфидные связи и корректировать фолдинг, что оказывает влияние на функциональное состояние белка. Кроме того, S-глутатионилирование выступает как протекторный механизм от дальнейшего окисления сульфеновой кислоты (Cys-SOH), образовавшейся в результате окисления остатков цистеина, в сульфиновою (Cys-SO₂H) и далее в сульфоновою (Cys-SO₃H), восстановление которой при физиологических условиях невозможно [20].

Обратимость процессов окисления остатков цистеина крайне важна для нормального функционирования белков и их способности, в частности, участвовать в каскадах передачи сигналов. В восстановлении окисленных остатков цистеина ключевым субстратом выступает GSH. Состояние системы тиол/дисульфид определяется клеточным редокс-статусом, характеризующим соотношением GSH/GSSG. При физиологических условиях GSH/GSSG составляет 100 : 1, что минимизирует окислительное действие АФК/АФА. Нарушение данного соотношения оказывает существенное влияние с точки зрения редокс-регуляции функционирования белков на процессы сигнальной трансдукции, контроля экспрессии генов, клеточной пролиферации, дифференцировки, состояние клеточного метаболизма и жизнедеятельности клетки в целом [18, 21] (рис. 2). Сверхпродукция глутатионилированных белков является индикатором развития окислительного стресса, впоследствии приводящего к клеточной гибели. Изменение в сульфгидрильном гомеостазе клетки, особенно установившегося режима глутатионилирования специфических регуляторных белков, модулирует различные пути передачи сигнала, преимущественно сдвигая состояние клетки от выживания к гибели. Например, функционирование клеточного актина происходит при посредничестве обратимого S-глутатионилирования, а нарушение S-глутатионилирования меняет структурную организацию стресс-фибрилл актинового цитоскелета [22]. При обычных условиях в клетке наличие связи белок-SSG временное и обратимое. Если остаток цистеина является существенным, то его S-глутатионилирование может нарушить функционирование белка. Так, в случае с транскрипционным фактором NF-κB S-глутатионилирование субъединиц p65

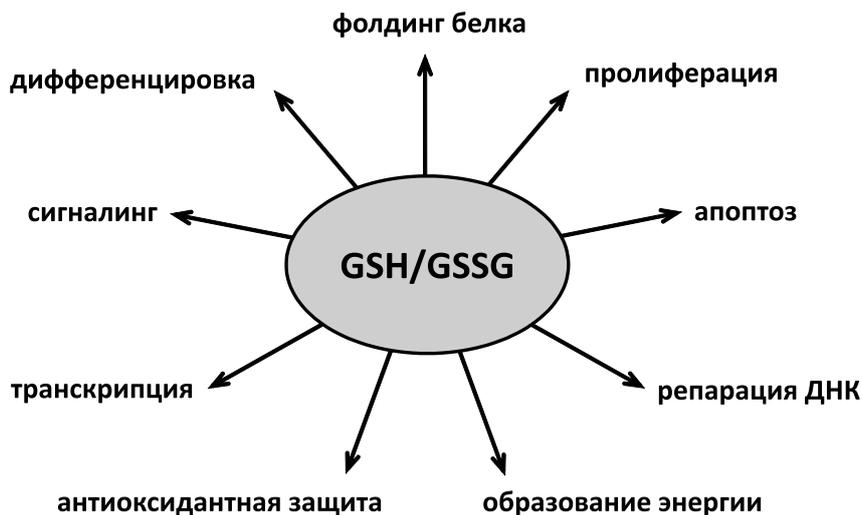


Рис. 2. Роль глутатиона в редокс-регуляции основных процессов жизнедеятельности клетки.

и p50 ингибирует их связывание с ДНК [23], в то время как S-глутатионирование β -субъединицы I κ B киназы репрессирует активацию NF- κ B [24].

GSH синтезируется исключительно в цитоплазме, откуда он доставляется в митохондрии, пероксисомы, эндоплазматический ретикулум и ядро. Более 70% общего пула GSH принадлежит цитозолю, тогда как ядро и митохондрии способны накапливать до 10% и 30% от общего внутриклеточного содержания глутатиона соответственно [25].

Недавние исследования показали, что GSH накапливается в ядре в начале G₁-фазы [26], поэтому он может играть важную роль в сохранении редокс-статуса ядра во время клеточного цикла [27]. В ходе митоза ядерная мембрана растворяется и формируется вновь вокруг дочерних ДНК, упакованных в хромосомы. На протяжении всего процесса деления клетки в непосредственной близости от хроматина сохраняется высокий пул глутатиона, что согласуется с данными о высоком редокс-потенциале делящейся клетки. Пул ядерного глутатиона (nGSH) обладает высокой степенью устойчивости к факторам, снижающим его содержание, по сравнению с теми изменениями, которые отмечены для общего уровня глутатиона клетки и глутатиона митохондрий под действием тиол-связывающих агентов

N-этилмалеимида и диэтилмалеата, а также ингибитора синтеза глутатиона бутионинсульфоксимида (BSO). Установлено, что клетки с высоким уровнем pGSH более устойчивы к апоптозу. Однако на настоящий момент роль pGSH в условиях окислительного стресса все еще остается малоизученной [27].

Механизмы транспорта и депонирования pGSH пока еще мало изучены. Возможно, что значительное количество pGSH поступает от родительского ядра к дочерним ядрам во время телофазы за счет сохранения высокой концентрации глутатиона в непосредственной близости от делящегося генетического материала [27].

Ядерные поры позволяют проникать различным ионам и небольшим молекулам внутрь ядра. По этому пути может осуществляться и диффузия глутатиона в ядро [28]. Однако также установлено существование АТФ-зависимого переноса GSH в ядро [29]. В настоящее время дискутируется роль белка Bcl-2 в трансмембранном транспорте GSH. Так, обнаружено, что содержание pGSH значительно повышено у опухолевых клеток, у которых наблюдается сверхэкспрессия гена *bcl-2* [30]. Следует отметить, что домен BH-3 белка Bcl-2 может связываться с GSH. Отмечается участие Bcl-2 в поддержании уровня глутатиона в митохондриях [31]. Эти данные, а также тот факт, что антиапоптотический белок Bcl-2 способен участвовать в формировании пор в мембране, свидетельствуют в пользу способности белков семейства Bcl-2 служить медиаторами транслокации GSH в ядро [26, 30].

Ряд работ, проведенных на клетках растений, показал, что процесс экспрессии генов чувствителен к накоплению GSH в ядре и его снижению в цитоплазме [30]. Снижение восстановительного потенциала в цитоплазме и его рост в ядре влияет не только на экспрессию генов, но и на способность белков связываться со своими мишенями в ядре. Установлено, что в начале G_1 -фазы клеточного цикла клеток животных активация процессов окисления в цитоплазме, вызываемая эпидермальным фактором роста, ведет к накоплению АФК, что стимулирует активацию каскадных процессов фосфорилирования и приводит к активации репликации ДНК и запуску процесса деления клетки [32]. Снижение уровня GSH в цитоплазме в фазе G_1 может способствовать росту АФК. Предполагается, что изменение редокс-статуса ядра, возможно, действует как триггерное звено для других компонентов, существенных для процесса транскрипции. Например, на такую возможность было указано в отношении белков NF-kB, AP-1 и p53 [33]. Так, для взаимодействия NF-kB с молекулой ДНК необходимо, чтобы остаток цистеина в ДНК-связывающем домене NF-kB был

восстановлен. Подобное отмечается и для таких транскрипционных факторов, как Fos, Jun и Nrf2 [30].

Изменение содержания глутатиона в ядре может модулировать структурную организацию хроматина [28]. Степень глутатионилирования ядерных белков возрастает в начале клеточной пролиферации [26]. При прохождении клетками животных от пролиферации через дифференцировку до своей гибели, они претерпевают изменения редокс-статуса в направлении более окисленного состояния. Таким образом, соотношение GSH/GSSG играет роль своеобразного «переключателя» от фазы пролиферации к фазе дифференцировки, а впоследствии и к запрограммированной клеточной гибели [34]. Ядерный глутатион связан с синтезом ДНК, возможно являясь «редокс-сенсором» для начала процесса синтеза ДНК, поддерживая при этом необходимую архитектуру в ядре за счет оптимального редокс-статуса для репликации ДНК и сохранения ее целостности. Обнаружено также, что nGSH оказывает влияние на протеасомную деградацию ядерных белков [26].

Наличие Se-зависимой глутатионпероксидазной активности установлено в ядерной фракции гепатоцитов крыс Wistar [35]. Для изоформы GPx4/snGPx (от англ. sperm nucleus-specific glutathione peroxidase) показано, что она вносит вклад в структурную стабильность хроматина сперматозоидов [36]. Локализация этого фермента в ядре подчеркивает важную роль глутатиона в регуляции клеточного цикла и хромосомной организации, так как вполне вероятно, что ядерные белки, главным образом гистоны и другие хроматин-связанные белки, должны поддерживаться в восстановленном состоянии для оптимального функционирования [27].

Следует подчеркнуть важную роль GSH при репарации поврежденных молекул ДНК. Глутатион не является очень эффективным радиопротектором для молекул ДНК при рентгеновском излучении, но он регулирует механизмы восстановления поврежденных молекул ДНК [37]. Важным компонентом механизма репарации повреждений, вызванных окислением, является поли(АДФ-рибоза)полимераза (PARP, от англ. Poly(ADP-ribose)polymerase), которая осуществляет рост полимерных цепочек из АДФ-рибоз на белках-мишенях (в частности на гистонах). Данный процесс происходит практически во всех эукариотических клетках в ответ на повреждение ДНК [38]. Экспрессия генов и активность белков семейства PARP связаны с уровнем nGSH во время клеточного цикла. Для клеток растений показано, что мРНК PARP1 и PARP2 возрастают параллельно росту пула глутатиона в ядре [39]. Подобный характер изменения актив-

ности полирибозилирования установлен для клеток линии NIH3T3 фибробластов: в их ядрах полирибозилирование гистонов возрастает во время пролиферации, когда уровень pGSH наивысший [26, 40].

Следует отметить, что в настоящее время пока еще остаются без ответа многие вопросы, касающиеся механизмов транспорта глутатиона в ядро, а также роли pGSH в различных генетических и эпигенетических процессах [26].

Большой интерес вызывает исследование роли митохондриального глутатиона (mGSH). Функции митохондрии очень тесно связаны с поддержанием клеточного редокс-баланса. Митохондрия является основным местом потребления кислорода и источником АФК, большая часть которых генерируется за счет работы цепи переноса электронов. При физиологических условиях за счет одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода может образоваться супероксидный анион-радикал O_2^- , дающий начало другим АФК. Концентрация O_2^- в матриксе митохондрии в стационарном состоянии от 5 до 10 раз выше, чем в цитоплазме [41]. Действие разного рода токсинов и развитие патологических состояний, нарушающих функционирование митохондрии, может вызывать повышение уровня АФК. Наличие в митохондрии антиоксидантной защитной системы позволяет сохранить ее функции без значительных нарушений. Существенной составной частью этой системы служит mGSH, предохраняя либо восстанавливая повреждения, образующиеся при аэробном метаболизме.

Инактивацию O_2^- в митохондрии осуществляет марганец-зависимая супероксиддисмутаза, дисмутирующая O_2^- с образованием H_2O_2 , которая может быть обезврежена глутатионпероксидазой. Наиболее активна в отношении H_2O_2 изоформа глутатионпероксидазы GPx1, локализованная главным образом в цитоплазме, однако небольшое её количество присутствует в матриксе митохондрий [42]. В митохондриях GST катализирует образование GS-конъюгатов и восстановление органических гидроперекисей с участием GSH в качестве косубстрата. В отличие от селенсодержащей GPx GST не взаимодействует с H_2O_2 , однако эффективно восстанавливает гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот (линоленовой и арахидоновой), фосфолипидов, гидроперекиси мононуклеотидов и ДНК. В детоксикации гидроперекисей липидов митохондрий важное значение имеет Se-независимая GPx4. Недавно показано, что GPx4 защищает клетки от активации апоптоза с участием белка AIF (от англ. apoptosis inducing factor, апоптоз-индуцирующий фактор) и поддерживает процесс окислительного фосфорилирования в клетках

эпителия кишечника [43]. Благодаря способности восстанавливать гидроперекиси кардиолипина GPx4 участвует в регуляции выхода апоптогенных белков из митохондрий [44]. В митохондриях клеток человека пероксидазной активностью обладают изоформы GST hGSTA4-4, hGSTA1, hGSTA2 и hGSTP1, среди которых наиболее активна hGSTA4-4 [45]. Митохондриальной изоформой глутаредоксина является Grx2, которая также локализуется в ядре. Интересно, что его окисленная форма может быть восстановлена как тиоредоксинредуктазой (TrxR), так и GSH, что обеспечивает функциональную активность Grx2 в окисленном микроокружении, характерном для митохондрии. В митохондриях Grx2 играет важную роль во взаимодействии пула GSH с тиолами белков, в системе антиоксидантной защиты и при осуществлении редокс-зависимого сигналинга [45–47]. Тиоредоксин-зависимая система представлена в митохондриях тиоредоксином 2 (Trx2) и TrxR2, а среди изоформ пероксиредоксина существенную роль играет Prx3. Системы mGSH/GPx и Prx3/Trx2, защищающие от H₂O₂, взаимосвязаны. Так, показано, что снижение mGSH приводит к окислению Trx2 [48]. Очевидна роль редокс-цикла mGSH в поддержании работоспособной антиоксидантной системы и гомеостаза пероксида водорода в митохондриях.

Содержание mGSH примерно такое же, как в цитоплазме (10–14 mM) [42]. Так как в митохондрии синтеза глутатиона не происходит, он поступает в нее извне. Через наружную митохондриальную мембрану GSH легко проходит по пориновым каналам. Поскольку при физиологических условиях GSH имеет анионную природу, он не способен диффундировать в матрикс через внутреннюю мембрану митохондрии, имеющую высокий отрицательный трансмембранный потенциал. В митохондриальном матриксе GSH поступает с помощью транспортеров, локализованных на внутренней мембране митохондрии и работающих против градиента электрохимического потенциала. В митохондриях почек и печени эту роль выполняют переносчик 2-оксиглутарата (OGC) и переносчик дикарбоксилатов (DIC), которые по механизму антипорта закачивают GSH в митохондриальный матрикс в обмен на 2-оксиглутарат и неорганический фосфат соответственно [42]. Так как эти транспортеры только на 45–50% обеспечивают потребление глутатиона митохондриями печени, предполагается существование дополнительного механизма транспорта GSH в митохондрии.

GSSG не поступает из митохондрии в цитоплазму и восстанавливается митохондриальной глутатионредуктазой в GSH. Этот процесс зависит от наличия достаточного количества НАДФН(H⁺). Следует

отметить, что накопление GSSG влияет на глутатионирование митохондриальных белков, что изменяет их функциональную активность. Так, регуляция активности НАДН-убихинон-редуктазы (комплекс I дыхательной цепи митохондрий) связана с величиной отношения GSH/GSSG [49]. В экспериментальной модели с использованием митохондриальных мембран из сердца крысы установлено, что добавление GSSG вызывало глутатионирование комплекса I. Напротив, введение GSH и Gtx2 активировало его деглутатионирование [50]. Для митохондрий сердца быка показано, что остатки цистеина Cys531 и Cys704 субъединицы весом 75кДа (субъединица NDUSF1) являются сайтами S-глутатионирования в комплексе I [51]. Следует подчеркнуть, что роль S-глутатионирования важна в защите НАДН-убихинон-редуктазы от необратимого окисления и в контроле образования в митохондриях АФК в ответ на изменения в локальном редокс-окружении. При этом важным условием является согласованное S-глутатионирование комплекса I и α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса, так как последний поставляет НАДН(H^+) для окисления комплексом I, т.е. оба белковых комплекса вносят вклад в генерацию АФК в митохондриях [52]. В условиях окислительного стресса глутатионирование двух ферментных комплексов снижает их активность и образование АФК [53, 54]. При снижении уровня O_2^- и H_2O_2 до нормального α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс и НАДН-дегидрогеназа деглутатионируются с помощью Gtx2 и окислительное фосфорилирование восстанавливается.

РОЛЬ ГЛУТАТИОНА В РЕДОКС-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА

Значительный ряд работ посвящен исследованию протекторной роли GSH в механизме апоптоза. Согласно современным представлениям снижение уровня GSH ниже определенного порогового значения ведет к появлению сигнала к развитию апоптоза, который инициируется активацией рецептора смерти или митохондриальным апоптопотическим сигналингом. Напротив, повышение содержания GSH обеспечивает клеточную защиту от Fas-индуцируемого апоптоза [55]. Многочисленные данные указывают на ключевую роль GSH в защите клеток от воздействия различных апоптопотических стимулов, поскольку нарушение редокс-гомеостаза клетки из-за окисления GSH или вследствие экспорта GSH способствует развитию апоптоза [56, 57].

В ряде работ с различными типами клеток показано, что запуску митохондриального апоптопотического сигналинга предшествует нарушение баланса GSH/GSSG, возникающего в результате рез-

кого повышения концентрации GSSG после воздействия оксиданта [58–61]. Восстановление соотношения GSH/GSSG до значений нормы после действия оксиданта не спасает клетки от развития апоптоза, что свидетельствует о том, что он был запущен и получил развитие на раннем периоде сдвига баланса между GSH и GSSG. Использование тиолового антиоксиданта N-ацетилцистеина до действия соединений, вызывающих окислительный (например, трет-бутилгидропероксид) или карбонильный (например, метилглиоксаль) стресс, блокирует индуцируемый ими апоптоз. Эти данные согласуются с данными других лабораторий о том, что сигнал апоптотической гибели запускается начальным ранним снижением соотношения GSH/GSSG [58, 59, 61, 62]. При этом отмечается отсутствие влияния N-ацетилцистеина на развитие апоптоза после действия оксидантов.

Запуск апоптоза при окислительном стрессе вызывается активацией митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) [63]. Различают три класса МАРК: ERK (от англ. extracellular signal-regulated kinase), JNK (от англ. c-Jun N-terminal kinase) и p38 [63]. Каскад сигнальной трансдукции включает в себя последовательные этапы фосфорилирования, благодаря которым активация специфической МАРККК (МАРЗК, киназа киназы МАРК) ведет к последующей активации специфической киназы МАРК (МАР2К), которая в свою очередь активирует МАРК [64]. Со стресс-индуцированным апоптозом связана активация JNK и p38 МАРК, этот процесс может осуществляться через запуск последовательности киназ ASK1 (от англ. apoptosis signal-regulating kinase-1), MEK4/7 (от англ. МАРК kinase-4/7) и JNK либо через запуск киназ ASK1, MEK 3/6 (от англ. МАРК kinase-3/6) и p38 [63, 65].

В настоящее время все еще мало изучено участие GSH в редокс-зависимых механизмах регуляции апоптотического сигналинга, связанного с МАРК. Поскольку GSH является ключевым фактором в поддержании внутриклеточного редокс-гомеостаза и играет важную роль в антиоксидантной защите клеток, то вероятно он может быть модулятором МАРК-зависимых сигнальных путей. Действительно, на некоторых клеточных моделях было установлено, что дисбаланс GSH/GSSG активировал МАРК-сигналинг и провоцировал апоптоз. Например, активация образования АФК алоэ-эмодином приводила к дисбалансу соотношения GSH/GSSG и редокс-зависимой активации GSTP1/JNK-сигналинга в клетках гепатомы [66].

В других работах было показано, что нарушение синтеза GSH *de novo* действием BSO содействует редокс-активации МАРК и апоптотического сигналинга. Так, воздействие на раковые клетки

молочной железы противоопухолевого средства аплидина после обработки их BSO вызывало активацию JNK- и p38-зависимых сигнальных путей и развитие апоптоза [67]. Апоптоз клеток HepG2, предварительно обработанных BSO, индуцировался андрографолидом с активацией сигнального каскада ASK1/MEK4/JNK [68]. Добавление тиолов (N-ацетилцистеина и GSH) предотвращало активацию MAPK, индуцируемую токсинами, что согласуется с ролью GSH в функционировании MAPK и клеточном ответе на стресс [67].

При исследовании роли GSSG в инициации апоптоза установлено, что внеклеточный GSSG может селективно активировать MAPK-названный каскад ASK1/MEK3/6/p38 через механизм GSSG-индуцированного тиол-дисульфидного обмена на клеточной мембране и образование смешанных дисульфидов белков [69]. Такой редокс-стресс в свою очередь может приводить к распаду комплекса Trx1/ASK1 и активации p38-зависимого пути развития апоптоза [69]. Данные о том, что каждое из этих событий предотвращается действием восстановленного глутатиона, согласуются с представлениями о протекторной роли GSH [69]. В связи с этим следует отметить, что в клетках нейробластомы линии SH-SY5Y, устойчивых к GSSG-индуцируемому апоптозу, активация апоптоза отмечалась после предварительной обработки BSO, которая сопровождалась повышением генерации АФК и активацией JNK [70]. Такие данные свидетельствуют в пользу того, что истощение определенного порогового значения GSH является необходимым условием для активирующего влияния GSSG на MAPK-сигналинг и индукцию апоптоза.

GSH способен регулировать редокс-состояние Trx1 и зависимого от Trx1 ASK1-сигнального каскада активации апоптоза. Так, действие на клетки аденокарциномы желудка агентов, окисляющих GSH (диамида или дитионитробензоата), инициировало митохондриальный путь апоптоза [71]. При этом редокс-активация сигнального каскада Trx1/ASK1/p38 запускалась в результате повышения содержания GSSG. Устойчивость клеток к H_2O_2 и АФК-продуцирующим системам (паквату и ксантин/ксантинооксидазе) коррелировала с Nrf2-зависимым повышением GSH и S-глутатионилированием белков [71]. Другой ответ наблюдался в клетках нейробластомы SH-SY5Y [72]. В этом случае действие H_2O_2 активировало каскад Trx1/p38/p53 и клеточный апоптоз, тогда как диамид активировал ERK-сигналинг, Nrf2-зависимое повышение содержания GSH и экспрессии гена гемоксигеназы-1, что способствовало выживанию клеток.

В отношении регуляции GSH-зависимых посттрансляционных модификаций остатков цистеина белков, участвующих в MAPK-сигналинге, можно отметить, что при окислительном стрессе, вызванном менадионом (2-метил-1,4-нафтохиноном), S-глутатионилирование Cys1238 в АТФ-связывающем домене MEKK1 приводит к ингибированию активности киназы [73]. Однако пока остается открытым вопрос о понимании конкретной связи между окислительным стрессом и S-глутатионилированием в отношении активации/инактивации специфических MAPK-зависимых сигнальных путей и развития апоптоза.

Приведенные данные показывают, что в редокс-регуляции MAPK-зависимых путей сигнальной трансдукции GSH отводится важная роль. Однако различие в стимулировании различных путей сигналинга, отвечающих либо за гибель, либо за выживание видимо определяется не только клеточным содержанием GSH, но и типом клеток [71, 72].

В последние годы большое внимание уделяется изучению митохондрии как органеллы, играющей важную роль в активации апоптоза. Соотношение GSH/GSSG рассматривается как основная редокс-система, поддерживающая редокс-гомеостаз митохондриального матрикса и осуществляющая защиту белков и ДНК митохондрий от действия АФК. На различных клеточных моделях показано, что селективное снижение содержания митохондриального глутатиона сопровождается снижением активности комплексов дыхательной цепи, повышением продукции АФК, снижением трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi$) и выходом из митохондрии апоптогенных факторов. Например, в диабетических кардиомиоцитах стресс-индуцированное окисление митохондриального, но не цитоплазматического GSH, приводило к снижению $\Delta\Psi$, активации каспазы-9 и каспазы-3 [74]. В клетках В-клеточной лимфомы человека АФК-зависимое снижение mGSH инициировало апоптоз, сопровождающееся резким падением $\Delta\Psi$, высвобождением цитохрома *c* и активацией каспазы-3 [75].

Прямая связь между снижением mGSH и активацией апоптоза была показана для различных типов клеток. Снижение mGSH в гепатоцитах являлось необходимым условием TNF- α -индуцированного апоптоза, которому предшествовали tBid/Bax-инициированная проницаемость митохондриальной мембраны, высвобождение цитохрома *c*, сборка апоптосомы и активация каспазы-3 [76]. В клетках толстого кишечника окисление mGSH было основным в развитии индуцируемой менадионом дисфункции митохондрий и цитохром *c*-зависимой активации апоптоза [77].

До конца точный механизм нарушения функционирования митохондрий, вызываемый снижением mGSH, пока не выяснен. Однако установлено, что цисплатин-индуцируемый апоптоз связан с дисбалансом соотношения mGSH/GSSG, снижением НАДФН(H^+) и окислительными повреждениями кардиолипина и аконитазы, что приводит к нарушениям энергетики митохондрий и активации каспазы-3 [78, 79]. В более поздних работах показано, что быстрое снижение mGSH запускает генерацию АФК/АФА и вызывает апоптоз в клетках HL-60 и Raji через дестабилизацию Fe-S кластера в субъединице NDUGS3 комплекса I дыхательной цепи и разрушение этого комплекса, что приводит к ингибированию дыхания и утрате $\Delta\Psi$ [80]. Заслуживает внимания тот факт, что в гепатоцитах небольшое снижение mGSH, вызываемое умеренной гипоксией, не сопровождается апоптозом. Эти данные указывают на необходимость для активации апоптоза достижения определенного порога при снижении концентрации mGSH [25].

Снижение mGSH может контролировать проницаемость митохондриальной мембраны. Ранние работы связывают снижение mGSH с изменением митохондриальной проницаемости, которая происходит благодаря редокс-модуляции адениннуклеотидтранслоказы и ведет к выходу из митохондрии в цитоплазму апоптогенных факторов, таких как цитохром *c* и AIF [81, 82]. Более поздние исследования показывают, что изменение редокс-баланса mGSH является ключевым фактором для регуляции проницаемости мембраны митохондрий [83]. Снижение mGSH/GSSG от 300 : 1 до 20 : 1 приводит к открытию анионного канала на внутренней митохондриальной мембране и митохондриальной поры. Если соотношение GSH/GSSG находится в пределах 150 : 1–100 : 1 отмечается неустойчивость $\Delta\Psi$, а в условиях большего окисления, когда это соотношение меньше 50:1, происходит необратимая деполяризация мембраны митохондрии, открытие каналов и связанное с этим разрушение митохондрии [83]. Рост транспорта глутатиона в митохондрии препятствует индуцированному менадионом повышению уровня mGSSG и предотвращает снижение уровня АТФ, падение $\Delta\Psi$, выход цитохрома *c* в цитоплазму и активацию каспазы-3 и каспазы-9 [77].

III. РОЛЬ ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗЫ В РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССАХ

Значительная роль в клеточных редокс-зависимых процессах принадлежит глутатион S-трансферазе (КФ 2.5.1.18), образующей суперсемейство изоформ, катализирующих конъюгацию глутатиона с широким рядом неполярных соединений эндогенного и экзогенного происхождения, содержащих электрофильные атомы углерода, серы, азота и фосфора, что вносит важный вклад в защиту клетки от возможного токсического действия этих соединений [84–87]. К настоящему моменту изоферменты GST обнаружены в большинстве живых организмов, включая аэробные бактерии, дрожжи, растения, насекомых и позвоночных. В суперсемействе GST выделяют три субсемейства изоформ: цитозольные, митохондриальные и микросомальные.

У млекопитающих GST присутствует практически во всех органах и тканях, при этом содержание фермента в печени наибольшее. На долю цитозольных изоформ приходится примерно 90% активности GST в клетке. На основании сходства аминокислотной последовательности цитозольные изоформы GST у млекопитающих группируются в семь классов (α , μ , π , θ , ζ , ω , σ), которые объединяют 17 изоформ [84, 85]. У человека и грызунов цитозольные изоформы в пределах одного класса имеют более 40% гомологии (иногда этот показатель превышает 90%), между разными классами гомология сохраняется менее чем на 25%. Более пристальное внимание в современной классификации уделяется анализу первичной последовательности более консервативного N-конца полипептидной цепи, который содержит каталитические остатки тирозина, цистеина или серина [85, 86]. У видов, не принадлежащих к млекопитающим, обнаружены β , δ , ϵ , ϕ , λ , τ и ν классы изоформ GST [85, 88].

Микросомальные изоформы GST – это интегральные мембранные белки, которые в настоящее время получили название «мембран-связанных белков метаболизма эйкозаноидов и глутатиона» (MAPEG, от англ. membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) [89, 90]. Изоформы микросомального MAPEG субсемейства разделяются на 4 субгруппы (I–IV), у представителей которых сходство аминокислотных последовательностей составляет менее чем 20%. У человека обнаружены 6 изоферментов, принадлежащих к I, II и IV субгруппам [90]. Как и представители цитозольных изоформ GST микросомальные изоформы катализируют конъюгацию GSH с электрофильными соединениями, но кроме того принимают участие

в процессах изомеризации ненасыщенных соединений и биосинтезе лейкотриенов и простагландинов [85].

Митохондриальной изоформой GST человека является изоформа GSTK1-1, принадлежащая к-классу [89]. Эта изоформа обнаружена и в пероксисомах человека [12]. GSTK1-1 грызунов и человека проявляет активность в отношении целого ряда традиционных для GST субстратов, в частности к 1-хлор-2,4-динитробензолу, а у *Caenorhabditis elegans* она участвует в энергетическом обмене и метаболизме липидов [91].

Цитозольные и митохондриальная изоформы GST являются гомо- или гетеродимерами, при этом субъединицы в составе гетеродимеров принадлежат одному и тому же классу. Если цитозольные изоформы GST являются димерами, то представители микросомального субсемейства могут быть моно-, ди- и тримерами, а также наблюдаются мультимерные комплексы [85, 92]. Каждая субъединица состоит из двух доменов, соединенных небольшим неупорядоченным участком. N-концевой домен (G-сайт) – место связывания GSH – обладает топологией, подобной тиоредоксину, и состоит из четырех β -складчатых слоев ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ и $\beta 4$), три из которых расположены антипараллельно, и трех α -спиралей. Эти элементы вторичной структуры скомбинированы в последовательности $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$. C-концевой домен (H-сайт) – место связывания косубстрата – это полностью α -спиральный участок, состоящий либо из 5, либо из 6 α -спиралей ($\alpha 4$ –8 или $\alpha 4$ –9). Дополнительной $\alpha 9$ -спиралью обладают изоферменты α , θ и ω классов в отличие от изоферментов других классов. У изоформ μ -класса есть уникальная μ -петля на C-конце. У изоферментов ω -класса на N-конце обнаружена дополнительная последовательность из 19 аминокислот, а у изоформ GST θ -класса между $\alpha 4$ - и $\alpha 5$ -спиралями находится большая петля [84, 93]. Различия в структурах представителей разных классов изоформ GST обеспечивает их широкую субстратную специфичность и разнообразие функций.

Всесторонний сравнительный анализ аминокислотной последовательности и структуры цитозольных изоформ GST, в особенности наличие определенных аминокислотных остатков в активном центре, позволил разделить их на две субгруппы: Y-GST – изоформы, у которых для активации GSH используется тирозин (α , μ , π и σ классы), и S/C-GST – изоформы, у которых взаимодействие с GSH осуществляется через остаток серина (ϕ , τ , θ и ζ классы) или цистеина (β и ω классы) [93]. У представителей обеих субгрупп, а также у митохондриальных изоформ GST эти важные для активации GSH аминокислотные остатки располагаются в так называемой «катали-

тической петле», находящейся после первого β -складчатого слоя в тиоредоксин-подобном домене. Как уже отмечалось выше, структура Н-сайта обладает значительной вариабельностью при сравнении структуры представителей различных классов.

При формировании димеров осуществляется взаимодействие между доменом I одной субъединицы и доменом II соседней по принципу «мяч-впадина» или «ключ-замок». В качестве «ключа» выступают определенные ароматические остатки из петли между $\alpha 3$ -спиралью и $\beta 2$ -слоем первого мономера и располагаются в гидрофобном «замке», образуемом впадиной между $\alpha 4$ - и $\alpha 5$ -спиралями второго мономера.

К основным функциям GST наряду с важной ролью в системе детоксикации относится участие в работе антиоксидантной системы благодаря способности восстанавливать органические гидроперекиси до спиртов, используя GSH в качестве косубстрата [85]:



За счет Se-независимой глутатион-пероксидазной активности GST восстанавливает гидроперекиси полиненасыщенных высших жирных кислот, фосфолипидов, холестерина [94, 95]. Среди продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) субстратами изоформы GSTA4-4 являются акролеин, 4-гидрокси-ноненаль (4-HNE) [96], конъюгация которых с глутатионом защищает молекулы белков и ДНК от ковалентной модификации. В результате окислительного стресса могут окисляться нуклеотиды с образованием основных пропеналей и гидропероксидов, которые являются субстратами для GSTP1-1. Окисление катехоламинов также приводит к образованию соединений (аминохром, допахром, норадренохром, адренохром), являющихся субстратами изоформ GST. Конъюгация таких соединений с глутатионом вносит определенный вклад в систему антиоксидантной защиты клеток, так как в своем составе они содержат хинонную структуру, благодаря которой могут вызывать образование O_2^- , а следовательно и способствовать развитию окислительного стресса [85]. Для цитозольной GSTM2-2 показано, что она детоксицирует О-хиноны дофамина, что защищает дофаминергические системы головного мозга от дегенеративных процессов [97]. GSTP1-1 может опосредованно участвовать в защите от окислительного стресса, восстанавливая пероксидазную активность окисленного перокси-редоксина Prx6 [98].

Существенной является роль GST в регуляции клеточного сигналинга за счет белок-белковых взаимодействий с киназами, которые

активируются окислительным стрессом. При физиологических условиях часть GSTP1-1 находится в связанном состоянии с киназой JNK1, делая её неактивной и регулируя, таким образом, базовый уровень JNK1. При воздействии на клетку факторов, повышающих уровень АФК, что наблюдается, например, при действии ряда противоопухолевых препаратов, происходит распад комплекса GSTP1-1 и JNK1 и олигомеризация GSTP1-1. После освобождения JNK1 запускает каскад событий, начинающихся с фосфорилирования Jun-с, что в итоге приводит к активации апоптоза. Повышенная экспрессия гена изоформы GSTP1-1, наблюдающаяся в некоторых типах опухолей, может вызывать инактивацию JNK1, и, следовательно, супрессию сигнального пути, ведущего к апоптозу, что вносит существенный вклад в формирование лекарственной устойчивости опухолевых клеток [8, 99]. Подобное взаимодействие GSTP1-1 с TRAF2 (фактором 2, связанным с рецептором TNF- α) блокирует действие киназ JNK1, p38 и ASK1 в регуляции сигнального каскада, вызываемого TNF- α . Распад комплекса GSTP1-1 и TRAF2 активирует пролиферацию при низком уровне окислительного стресса, тогда как при длительном и высоком уровне развития окислительного стресса наблюдается развитие апоптоза [100]. Стоит отметить, что каталитическая активность GSTP1-1 не изменяется в результате белок-белкового взаимодействия, что свидетельствует о том, что в этом процессе не участвуют сайты активного центра фермента [86].

Изоформа GSTA1-1 также участвует в регуляции апоптотических сигнальных путей посредством белок-белкового взаимодействия с JNK1. Повышенная экспрессия гена GSTA1-1 значительно снижает количество клеток, вступающих на путь апоптоза, за счет ингибирования JNK1-зависимого фосфорилирования Jun-с и активации каспазы-3 [101]. GSTM1-1 обладает подобными GSTP1-1 регуляторными функциями. Комплекс GSTM1-1 и ASK1 является существенным в поддержании базового уровня фосфорилирования p38. В стрессовых условиях теплового шока и при повышении уровня АФК происходит диссоциация этого комплекса, GSTM1-1 олигомеризуется, тогда как ASK1 активируется [102]. Поскольку ASK1 – киназа киназы MAPK, активирующая JNK1- и p38-зависимые сигнальные пути, то диссоциация данного комплекса влечет за собой цитокин- и стресс-индуцированный апоптоз [103].

Как уже обсуждалось выше, для GST показано участие в процессе S-глутатионилирования. Первоначально считалось, что в ответ на повышение продукции АФК идет рост S-глутатионилирования для защиты остатков цистеина белков от необратимого окисления и нару-

шения функций белков [34]. Впоследствии оказалось, что S-глутатионилирование играет важную роль в механизмах клеточного сигналинга за счет чувствительности остатков цистеина к редокс-модификации. Список протеинов, структура, а, следовательно, и функции которых модулируются за счет S-глутатионилирования, широк: белки, участвующие в метаболизме, белки, формирующие цитоскелет и ионные каналы, сигнальные белки (киназы и фосфатазы), факторы транскрипции, gas-белки, белки теплового шока [104].

Процесс S-глутатионилирования может протекать как неферментативно, так и при участии ферментов, к числу которых относится GSTP1-1. Способность GSTP1-1 к S-глутатионилированию основана на каталитической активности фермента. В условиях окислительного стресса GSTP1-1 подвергается авто-S-глутатионилированию по остаткам Cys-47 и Cys-101, каждый из которых влияет на каталитическую активность изоформы и на её способность связывания с белками-мишенями. Кроме того, специфическое S-глутатионилирование вызывает олигомеризацию GSTP1-1, что возможно имеет значимые последствия для других компонентов ответа клетки на стресс. S-глутатионилирование в мономере GSTP1-1 ведет к снижению количества α -спирализованных участков, т.е. к изменению вторичной структуры, что в свою очередь вносит вклад в изменение третичной и четвертичной структуры [105], изменяя способность этой формы GSTP связываться с белками. Примером такого влияния является комплекс GSTP1-1 и JNK1. S-глутатионилирование по остаткам Cys-47 и/или Cys-101 в GSTP1-1 ведет к распаду комплекса GSTP1-1 с JNK1, активации JNK1 и агрегации GSTP1-1 [105].

Способность гомодимеров GSTP1-1 (а в некоторых случаях GSTM1-1) к диссоциации и формированию гетеродимеров с другими мономерными белками имеет решающее значение для её способности обеспечивать эти белки глутатионом [106, 107]. Цитозольные изоформы GST каталитически активны в димерной форме, при этом поверхность димера служит местом для некаталитического связывания лигандов. Ряд работ указывает на то, что изоформы GSTP1-1 и GSTM1-1 млекопитающих в виде мономеров могут взаимодействовать с ASK1, JNK1 или пероксиредоксином 6 (Prx6) [98, 100, 102]. При изучении структуры GSTP1-1 установлено, что особенности строения молекулы со стороны С-конца способствуют диссоциации гомодимера на мономеры, с другой стороны, Trx-подобный домен на N-конце GSTP1-1 может содействовать гетеродимеризации ее мономеров с другими белками, особенно с теми, которые также содержат Trx-подобный домен [108].

Примером белок-белкового взаимодействия GSTP1-1 с одновременным восстановлением белка с помощью глутатиона служит процесс восстановления пероксидазной активности Prx6. Prx6 имеет один каталитически активный остаток цистеина Cys47 на N-участке полипептидной цепи. Его окисление до сульфеновой кислоты инактивирует пероксидазную активность в отношении H₂O₂ и гидроперекисей фосфолипидов. Установлено, что только в комплексе с GSH изоформа GSTP1-1, образуя гетеродимер с Prx6, восстанавливает остаток Cys47. Связывание с GSH вызывает конформационные изменения, которые позволяют образоваться гетеродимеру GSTP1-1-Prx6 [109]. Далее происходит S-глутатионилирование Prx6 по окисленному Cys47, затем следует образование дисульфидной связи между Cys47 Prx6 и Cys47 GSTP1-1, после чего эта дисульфидная связь восстанавливается GSH.

GST принимает участие в регуляции работы серин/треониновой АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК), которая играет ключевую роль в контроле энергетического баланса клетки [110]. Многогранность действия АМФК заключается в контроле различных метаболических путей и физиологических процессов, таких как, например, пролиферация и подвижность клеток. АМФК может активироваться АФК и АФА через АМФ-зависимые и АМФ-независимые механизмы и вовлекаться в клеточную редокс-регуляцию [111]. В исследованиях *in vitro* в условиях близких к физиологическим было показано, что изоформы GSTM1-1 и GSTP1-1 млекопитающих способствуют S-глутатионилированию АМФК по тем же остаткам цистеина, как и при неферментативном H₂O₂-зависимом процессе, что также сопровождается повышением киназной активности [111–113]. Взаимодействие с АМФК вызывает активацию GSTM1-1 и GSTP1-1, которая в свою очередь приводит к S-глутатионилированию и активации АМФК. Эти данные хорошо сочетаются с ролью АМФК как важного звена в редокс-зависимой сигнальной трансдукции [114–116]. Активированная АМФК в свою очередь активирует транскрипционный фактор FOXO3, который через активацию сигнального пути PI3K/AKT влияет на такие процессы, как клеточная пролиферация, глюконеогенез, защита от окислительного стресса [117]. Вклад в антиоксидантную защиту FOXO3 вносит главным образом за счет повышения экспрессии генов Mn-супероксиддисмутазы, каталазы, тиоредоксина [118, 119], металлотионеинов [120], митохондриального разобщающего белка UCP2 [121], γ -глутамилцистеинсинтазы [118], глутатионпероксидазы [119], GSTM1-1 [120]. GST-опосредованное S-глутатионилирование и активация АМФК могут рассматриваться

как дополнительный механизм регуляции АМФК как редокс-сенсора в отношении энергетического стресса и антиоксидантной защиты [111].

Как уже отмечалось выше, одним из основных продуктов ПОЛ являются 4-HNE, образующие аддукты с белками и нуклеиновыми кислотами. 4-HNE участвуют в MAPK-зависимых сигнальных путях клеточного ответа на стресс, в частности путем инициации ускоренного фосфорилирования JNK и p38, что вызывает их активацию [122]. Установлена дозо-зависимая регуляция 4-HNE клеточных сигнальных путей: в концентрациях 10 мкМ и более 4-HNE вызывали цитотоксическое действие, при снижении концентраций (меньше 10 мкМ, в пределах физиологической нормы) 4-HNE модулировали клеточный рост, т.е. оказывали влияние на процесс пролиферации [123]. Кроме того, 4-HNE ингибируют экспрессию генов циклинов D1, D2 и A, а следовательно и активность циклин-зависимых киназ 4/6 (Cdk4/6) и Cdk2 [124], а также повышают экспрессию гена белка p21^{waf1}, который ингибирует работу некоторых циклин-киназных комплексов [125]. Таким образом, 4-HNE могут одновременно влиять на экспрессию различных генов, участвующих в контроле клеточной пролиферации. Несомненно, что внутриклеточное содержание 4-HNE должно тщательно регулироваться для предотвращения повреждения клетки и/или контроля стресс-зависимых сигнальных путей. Большая часть 4-HNE метаболизируется GST путем конъюгации с GSH, что способствует их дальнейшей детоксикации. Наиболее специфичной изоформой в отношении 4-HNE является GSTA4-4 [126–128].

Установлено, что в условиях развития окислительного стресса в цитоплазме усиливается процесс фосфорилирования субъединиц GSTA4, что способствует связыванию их с белком Hsp70, быстрой димеризации и последующей транслокации в митохондрии. Если субъединицы не подвергаются гиперфосфорилированию, то они не обладают высокой аффинностью к Hsp70. В этом случае образующиеся димеры остаются в цитоплазме [129]. Таким образом, активированный окислительным стрессом импорт в митохондрии GSTA4-4, обладающей высокой специфичностью в отношении 4-HNE, способствует защите митохондрий от развития окислительного стресса и оказывает модулирующее действие на сигнальные пути, в которых задействованы 4-гидроксиноненали [127, 129]. Следует отметить, что TNF α , IL-6 и эпидермальный фактор роста вызывают рост содержания GSTA4-4 в митохондриях *in vivo* [130]. При снижении уровня GSTA4-4 наблюдается рост продукции АФК и нарушение функциональной активности митохондрий, что вносит существенный вклад в развитие инсулиновой резистентности и диабета второго типа [131]. В целом,

полученные результаты различных исследований показывают, что контроль концентрации 4-HNE в клетке крайне важен для активности клеточного цикла и сигнальных каскадов, регулирующих клеточную дифференцировку, пролиферацию, трансформацию и апоптоз. При этом уровень 4-HNE находится в большой зависимости от активности GSTA4-4 как в цитоплазме, так и в митохондриях.

Следует отметить ряд особенностей вклада изоформы GSTP1-1 в редокс-зависимые пути регуляции клеточного сигналинга и метаболизма. Предполагается, что некоторые из многих изменений, происходящих с белками, участвующими в клеточном сигналинге, которые наблюдаются при остром или хроническом введении кокаина, могут быть связаны с S-глутатионилированием, катализируемым GSTP1-1. Например, актин, JNK и АМФ-зависимая протеинкиназа при действии кокаина регулируются через S-глутатионилирование [22, 105, 132–135]. Возможно, именно из-за повышения S-глутатионилирования происходит нейроадаптация при окислительном стрессе, индуцированном кокаином [135]. Для GSTP1-1 показано, что она может напрямую ингибировать циклин-зависимую киназу Cdk5, взаимодействуя непосредственно с ее регуляторной субъединицей p25/p35 [136]. Стимуляция Cdk5 вызывает генерацию АФК, что приводит к клеточной гибели благодаря регуляции по принципу обратной связи. В условиях нейротоксичности введение гена изоформы GSTP1-1 способствует успешной нейропротекции в результате способности GSTP1-1 модулировать Cdk5-зависимый сигналинг, что обеспечивает защиту от окислительного стресса и предотвращает нейродегенерацию [137].

Для GSTP1-1 показано, что вызывая снижение активации Jun-c, она может вызывать подавление появления и развития болезни Паркинсона [140]. Мыши, нокаутные по гену GSTP1-1, при действии 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина становились более чувствительными к нейротоксину, что приводило к раннему появлению дегенерации дофаминергических нейронов и волокон полового тела.

Гены изоформ GST по-разному экспрессируются в нормальной и опухолевой тканях. Так, высокий уровень экспрессии гена GSTP1-1 часто коррелирует с лекарственной устойчивостью, которая наблюдается в опухолевых тканях яичников, легких, молочных желез, толстого кишечника и при онкозаболеваниях крови [8]. Способность GSTP1-1 как ингибитора JNK1, ASK1 и TRAF2 регулировать киназные сигнальные пути, определяющие судьбу клетки, может обеспечить устойчивость опухолевых клеток к противоопухолевым

препаратам в том числе обладающим прооксидантным действием [138, 139]. Трансфекция гена изоформы GSTA1-1 в клетки H69 (мелкоклеточный рак легких человека) приводит к появлению устойчивости к доксорубину, обладающему прооксидантным действием [101]. Сверхэкспрессия гена GSTA1-1 защищала клетки от падения уровня GSH, вызываемого доксорубином, снижая тем самым степень активации ПОЛ. Кроме того, сверхэкспрессия гена GSTA1-1 приводила к существенному сокращению количества клеток, подвергнутых апоптозу, благодаря ингибированию как JNK1-зависимого фосфорилирования Jun-c, так и каспазы-3 [101].

На настоящий момент механизмы, регулирующие работу генов изоформ GST, изучены недостаточно полно. Показано, что различные по строению соединения как эндогенного, так и экзогенного происхождения являются индукторами GST. Многие из них осуществляют активацию транскрипции генов GST через действие в промоторной области на антиоксидант-респонсивный элемент (ARE), ксенобиотик-респонсивный элемент (XRE) и глюкокортикоид-респонсивный элемент (GRE) [141, 142]. Наличие ARE в промоторной области характерно для генов, продукты которых участвуют в защите клеток от действия окислительного стресса или ксенобиотиков, к которым относятся гены изоформ GST. Такие гены часто называют ARE генами, а соответствующие им белки – ARE белками. Экспрессия ARE генов регулируется транскрипционным фактором Nrf2. В норме Nrf2 располагается в цитоплазме в комплексе с белком Keap1, что создает условия для убиквитинилирования Nrf2 и его протеасомной деградации [85]. Механизм, который чаще всего рассматривается для объяснения активации Nrf2, состоит в том, что при развитии окислительного стресса происходит окисление остатков цистеина Keap1, комплекс Keap1–Nrf2 диссоциирует и транскрипционный фактор транслоцирует в ядро, где образует димер с малыми Maf белками. Данный комплекс активирует экспрессию генов, продукты которых участвуют в защите клетки [143]. Однако есть данные, которые свидетельствуют о том, что некорректно говорить о прямом распаде комплекса Keap1–Nrf2, поскольку данная связь обладает высокой аффинностью. Предполагается, что в условиях стресса меняется не сила связывания Keap1 и Nrf2, а происходит снижение способности Keap1 вызывать убиквитинирование Nrf2, что в конечном итоге позволяет транскрипционному фактору аккумулироваться в ядре и стимулировать экспрессию ARE генов [144].

IV. ГЛУТАРЕДОКСИН. РОЛЬ В РЕДОКС-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Глутаредоксин (КФ 1.20.4.1) является одним из наиболее значимых ферментов в процессах восстановления дисульфидов и деглутатионилирования. Изоформы Grx – термоустойчивые низкомолекулярные белки (10–16 кДа), функционирующие как GSH-зависимые оксидоредуктазы, относящиеся по своей структуре к суперсемейству Trx и наряду с Trx играющие важную роль в клеточных редокс-зависимых процессах. В N-концевом участке аминокислотной последовательности Grx находится сайт активного центра Cys–X–X–Cys/Ser, тогда как со стороны C-конца молекулы располагается консервативный глутатион-связывающий домен. Изоформы Grx обнаружены практически во всех живых организмах, за исключением некоторых типов бактерий и архей [145]. Существует дополнительное деление семейства изоформ Grx на основании наличия остатка цистеина в активном центре во второй позиции Cys–Cys–X–Cys/Ser, такие изоформы получили название Grx CC-типа. Первоначально функцией Grx считалась его способность восстанавливать дисульфидные связи и осуществлять деглутатионилирование. Однако позже было обнаружено, что определенные изоформы Grx предпочтительнее служат белками-переносчиками железо-серных кластеров [FeS], используя GSH в качестве лиганда [146]. Образующийся после восстановления дисульфидов белков и глутатионилированных тиолов окисленный Grx восстанавливается GSH (рис. 3). Однако некоторые изоформы Grx восстанавливаются ферредоксин- или НАДФН-зависимой тиоредоксинредуктазой, например, Grx4 *E. coli* и Grx2 человека [46]. В зависимости от строения активного центра изоформы Grx делятся на дитиольные (в активном центре находится последовательность Cys–X–X–Cys) и монотильные (в активном центре находится последовательность Cys–X–X–Ser) [147]. Связывание Fe–S-кластеров может приводить к образованию димеров и тетрамеров. При этом возможно образование различных альтернативных белок-белковых контактных сайтов у моно- и дитиольных изоформ Grx, что обеспечивает существование Grx в виде как моно-, так и мультидоменных форм [148].

По поводу классификации изоформ Grx необходимо отметить, что, поскольку, бактерии, дрожжи и млекопитающие обладают ограниченным набором представителей данного семейства белков, то простого разделение их на моно- и дитиольные изоформы оказалось достаточным, тогда как для фотосинтезирующих организмов, у

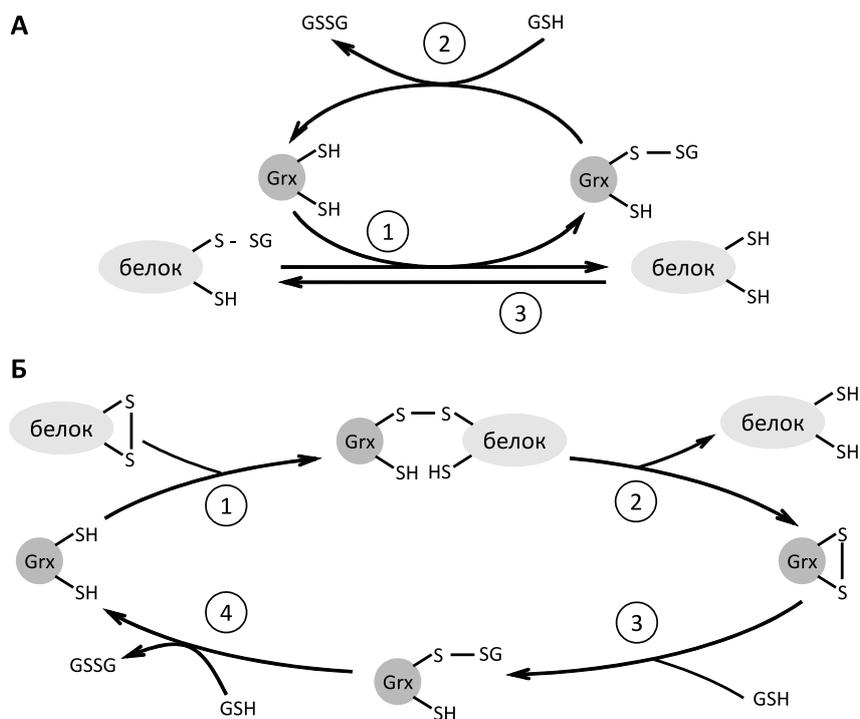


Рис. 4. Схема механизма тиол-дисульфидного обмена с участием глутаредоксина (Grx).

(А) Grx осуществляет деглутатионирование белка по монотиольному механизму с образованием смешанного дисульфида Grx (1), который восстанавливается GSH (2). В условиях окисления, когда значение отношения GSH/GSSG снижено, Grx может осуществлять S-глутатионирование белков (3).

(Б) Grx восстанавливает дисульфидные связи в белках по дитиольному механизму через образование промежуточного интермедиата Grx и субстрата (1, 2). Окисленный Grx восстанавливается с участием двух молекул GSH (3, 4).

с образованием внутримолекулярной дисульфидной связи Grx(S₂), которая формируется между каталитическим цистеином и одним из цистеинов рециркулирования. Далее дисульфидная связь восстанавливается либо при участии двух молекул GSH, либо при помощи тиоредоксинредуктазы. Если субстрат Grx нуждается в восстановлении внутри- или межмолекулярной дисульфидной связи (рис. 4, Б), Cys_A связывается временно с одним из цистеинов субстрата, затем восстановленный субстрат высвобождается и дисульфидная связь

формируется между Cys_A и Cys_B или Cys_C, на заключительном этапе идет восстановление дисульфидной связи Grx(S₂) при помощи либо двух молекул GSH, либо с участием тиоредоксинредуктазы [151]. Все исследованные на настоящий момент дитиольные изоформы Grx способны осуществлять катализ по моноотиольному механизму, но пока не все из них протестированы на способность к дитиольному катализу. Однако все дитиольные изоформы Grx, способные к дитиольному катализу, могут осуществлять и моноотиольный катализ.

У млекопитающих обнаружены четыре изоформы Grx: Grx1, Grx2, Grx3 (известный также как PICOT, от англ. protein interacting cousin of Trx) и Grx5 [152]. Дитиольный Grx1 локализован главным образом в цитоплазме, но также может транслоцироваться в ядро, секретироваться из клетки и локализоваться в межмембранном пространстве митохондрий [147, 153]. Дитиольный Grx2 первоначально был обнаружен исключительно в митохондриях, однако позже было установлено его присутствие в цитоплазме и ядре клеток яичек и в ряде опухолевых клеток [154]. Моноотиольный Grx3 является мультидоменным белком и присутствует в ядре и цитоплазме, тогда как моноотиольный Grx5 обнаружен в митохондриях [152].

Несмотря на то, что аминокислотные последовательности Grx1 и Grx2 совпадают только на 34%, эти изоформы используют один и тот же механизм катализа [155, 156]. Grx1 по сравнению с Grx2 активнее примерно в 10 раз, однако содержание последнего в межмембранном пространстве митохондрий выше по сравнению с Grx1, что, возможно, компенсирует разницу в их каталитической активности [73]. Окисленный Grx1 восстанавливается исключительно GSH, тогда как Grx2 может быть реактивирован как с участием глутатиона, так и тиоредоксинредуктазы, что характеризует его как белок, обладающий функциями как Grx, так и Trx [46], и свидетельствует о связи метаболических путей, контролируемых глутатионом и тиоредоксином, в митохондриях. Кроме того, возможность восстановления Grx2 с участием тиоредоксинредуктазы позволяет ему функционировать при достаточно широком диапазоне значений GSH/GSSG и в условиях довольно высокой степени развития окислительного стресса в митохондриях [50].

Grx1 и мономерный Grx2 способны катализировать как реакцию деглутатионирования, так и обратную ей реакцию S-глутатионирования. Направление реакции зависит от относительных концентраций «белок-SSG», «белок-SH», GSH и GSSG. Редокс-потенциал пары GSH/GSSG является наиболее значимым в определении клеточного редокс-потенциала. Величина редокс-потенциала

GSH/GSSG в значительной степени зависит от функционального состояния клетки. При пролиферации эта величина приблизительно равна -240 mV, в состоянии дифференцировки -200 mV, при развитии апоптоза продолжает расти примерно до -170 mV [157]. Установлено, что Grx действует как GSH-зависимая редуктаза при -240 mV, тогда как при -170 mV – как GSSG-зависимая оксидаза [158]. В условиях, когда значение отношения GSH/GSSG снижено, т. е. под влиянием окислительных факторов, Grx временно может осуществлять процесс S-глутатионилирования, тогда как при снижении действия окислительного стресса катализирует реакцию деглутатионилирования [159, 160]. Grx способствует процессу S-глутатионилирования белков путем связывания дисульфидной связью с радикалом GS[•] с образованием интермедиата в виде анионного радикала Grx-SSG^{•-}, который превращается в смешанный дисульфид PSSG [159]. Обращение S-глутатионилирования зависит от степени и длительности иницирующего стресса, при устранении которого, как правило, открывается возможность деглутатионилирования. При этом время полувосстановления глутатионилированных связей составляет 2–3 часа [105]. Очевидно, что Grx вносит существенный вклад в регуляцию сигнальной трансдукции через соотношение процессов глутатионилирования и деглутатионилирования.

Тиолы активного центра некоторых изоформ Grx способны формировать комплексы с железо-серными кластерами. К таким ферментам относится ограниченное число дитиольных изоформ Grx человека, растений, трипаносом и практически все монотиольные изоформы Grx [161–163]. Большинство таких комплексов обнаружено в митохондриях. Кластер $[2Fe_2S]^{2+}$ располагается между двумя мономерами Grx за счет координационных связей с двумя остатками цистеина их активных центров с N-концов и с двумя нековалентно связанными молекулами GSH. GSH поступает из пула свободного глутатиона, что свидетельствует о важной роли GSH в стабилизации Fe-S-кластеров [164]. Поскольку в связывании кофактора $[2Fe_2S]^{2+}$ холо-Grx-комплексом задействованы цистеиновые остатки, участвующие в катализе, то на время существования такого комплекса Grx ферментативно неактивен [161]. Дегградация кластера и диссоциация холо-комплекса возвращают активность Grx. Медленная дегградация комплекса в аэробных условиях эффективно предотвращается GSH. Напротив, GSSG способствует дегградации кластера и активации Grx [161]. Две молекулы GSH в комплексе успешно экранируют атомы железа от окружающей среды. Таким образом, железо из $[2Fe_2S]^{2+}$ не имеет возможности взаимодействовать

с окислителями, нуждающимися в прямом молекулярном взаимодействии, в частности H_2O_2 . Показано, что высвобождение мономеров Gtx вызывает действие $O_2^{\cdot-}$ [165]. Наиболее вероятно, что распад кластера в ответ на действие окислителя происходит при образовании GSSG. Предполагается, что комплекс Gtx2/Fe-S человека является своеобразным редокс-сенсором: при высоких значениях GSH/GSSG Gtx удерживается им в неактивном состоянии, тогда как высвобождение ферментативно активного Gtx происходит при окислительном сдвиге клеточного редокс-статуса [161, 166]. Кроме того, Gtx2 устойчив к окислительной инактивации [167], а также успешно выполняет функции резервной восстановительной системы Gtx1 в цитозоле и Gtx2 в митохондриях при действии ингибиторов тиоредоксинредуктазы. При сверхэкспрессии гена Gtx2 в митохондриях наблюдается высокая защита Gtx2 от окисления, что приводит к значительному снижению развития апоптоза, вызываемого ростом образования АФК в митохондриях [167].

Недавние исследования показали важную роль цитозольных мультидоменных монотиольных изоформ Gtx3 и Gtx4 дрожжей в внутриклеточном распределении железа [168]. Комбинированное снижение Gtx3 и Gtx4 приводит к замедлению всех железо-зависимых реакций в цитозоле, митохондриях и ядре, что вызывается недостаточным насыщением органелл железом и включением его в структуры белков, несмотря на достаточное количество в цитоплазме. Способность Gtx связывать Fe-S-комплексы само по себе является необходимым для биодоступности железа в клетке [168].

Для лучшего понимания клеточных функций различных изоформ Gtx человека необходимо продолжать изучение их специфичности в отношении различных дисульфидов с учетом разнообразной клеточной локализации, а также исследовать их особый вклад в процессы транспорта железа и поддержание железо-серных кластеров. В этом ключе интересно недавнее исследование Gtx5, показавшее, что ген этой изоформы имеет достаточно высокий уровень экспрессии в клетках костной ткани, а в остеобластах играет антиапоптотическую регуляторную роль [169]. Однако не установлено, что именно приводило к изменениям в развитии апоптоза, индуцированного окислительным стрессом, при манипуляции с уровнем Gtx5 (сверхэкспрессия или условия нокаута по гену данной изоформы): изменения тиол-дисульфидного гомеостаза или гомеостаза железо-серных кластеров.

При тиол-дисульфидном обмене происходят изменения не только в структуре субстратов, но также и в структуре Grx. Так, при сравнении окисленной и восстановленной форм Grx1 *E. coli* и Grx1 бактериофага T4 оказалось, что структуры двух форм этого изофермента очень похожи, хотя есть небольшие отличия [170, 171]. При наличии смешанной дисульфидной связи с GSH Grx1 *E. coli* проявляет больше свойств окисленной белковой структуры [172]. Структурные изменения происходят около активного центра и вызывают повышенную гибкость в этой области у восстановленной формы фермента. Кроме того, у окисленного Grx поверхность молекулы, участвующая в белок-белковом взаимодействии, скрыта. Поэтому аффинность Grx снижается как только субстрат восстанавливается и комплекс Grx-субстрат диссоциирует.

Специфическая регуляция активности белков через процессы глутатионилирования/деглутатионилирования важны для многих аспектов жизнедеятельности клетки, в частности в регуляции апоптотических сигнальных каскадов. Установлено, что TNF- α - и FasL-индуцированный апоптоз высокочувствителен к S-глутатионилированию. Так, в эпителиальных клетках легких глутатионилирование рецептора Fas по Cys294 легко осуществляется при деградации Grx1 с участием каспазы-8 и/или каспазы-3, что сопровождается усилением апоптоза [173]. Полученные результаты свидетельствуют в пользу существования отрицательной обратной связи между каспазой-3 и Grx, так как действие Grx приводит к активации прокаспазы-3, которая вызывает деградацию Grx. В то же время работы, проведенные *in vitro*, позволили установить инактивацию каспазы-3 посредством глутатионилирования [174]. Для более полного понимания взаимодействия Grx и каспазы-3 предстоит определить специфические остатки Cys, по которым осуществляется глутатионилирование/деглутатионилирование каспазы-3. Последнее представляется несомненно важным для выяснения связи редокс-статуса каспазы-3 и механизма активации апоптоза. Предполагается, что деглутатионилирование, катализируемое Grx, может играть принципиальную роль в механизме редокс-регуляции между пролиферацией и апоптозом, характер которого специфичен для различных типов клеток [175].

Следует отметить способность Grx к белок-белковому взаимодействию. Так, Grx принимает участие в регуляции протеинкиназы ASK1, активирующей JNK1- и p38-зависимые сигнальные пути активации апоптоза [103]. На многих клеточных линиях показано,

что ASK1 активируется АФК, в частности H_2O_2 , в результате распада комплекса с Grx1. Восстановленный Grx1 связывается с С-концевым доменом ASK1, что приводит к инактивации киназы. Напротив, окисление Grx1 ведет к распаду комплекса, активации ASK1 и индукции апоптоза [176]. Этот распад предотвращается, например, действием каталазы или N-ацетилцистеина. Снижение GSH при помощи BSO приводит к ингибированию связывания Grx1 с ASK1. Вероятно, GSH необходим для восстановления внутримолекулярных дисульфидных связей соседних остатков цистеина в Grx1, что создает способность к связыванию ASK1 и Grx1 [176]. Полученные результаты позволяют говорить о способности Grx1 выступать в качестве сенсорного фактора регуляции сигнальных каскадов MAP-киназ JNK1 и p38, чувствительного к редокс-статусу микроокружения.

Процесс глутатионилирования в клетках человека и других млекопитающих участвует в регуляции ряда ключевых белков и процессов при ответе на редокс-сигналы. Известно более 200 белков млекопитающих, участвующих в тиол-дисульфидном обмене. Так, например, установлено, что S-глутатионилирование ингибирует фосфофруктокиназу, карбоангидразу III, ядерный фактор NF1, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, протеинтирозинфосфатазу 1B, протеинкиназу Ca, креатинкиназу, актин, протеинфосфатазу 2A, протеинкиназу A, тирозингидроксилазу, комплекс I дыхательной цепи митохондрий, транскрипционный фактор NF-kB, IкB киназу (IKK). Напротив, при S-глутатионилировании активируются такие белки, как микросомальная глутатионтрансфераза, фосфатаза карбоангидразы III, протеаза ВИЧ-1, матриксные металлопротеиназы, ГТФ-аза HRAS, саркоплазматическая кальциевая АТФ-аза, комплекс II дыхательной цепи митохондрий. Развитие окислительного стресса и изменение функционирования Grx вызывают нарушение процесса регуляции S-глутатионилирования, что может вносить вклад в целый ряд патофизиологических изменений, наблюдающихся при различных заболеваниях, в частности при диабете, болезнях легких и сердца, онкологии, различных нейродегенеративных изменениях. Так, нарушение процесса глутатионилирования элементов цитоскелета вносит вклад в паталогические изменения сердечных и скелетных мышц при ишемии, в нейронах при атаксии Фридрейха [177]. Глутатионилирование актина предотвращает его полимеризацию, поэтому редокс-зависимое обратимое глутатионилирование актина регулирует структуру цитоскелета, что особенно важно для функционирования таких клеток, как тромбоциты, у которых актин является основным белком [178]. Показано также, что глутатионилирование

актина необходимо для распада актиномиозиновых комплексов при клеточной адгезии [22].

Для болезни Альцгеймера характерно изменение в энергетическом обмене частично из-за снижения активности α -кетоглутаратдегидрогеназы. Активность этого фермента снижается при глутатионилировании в условиях окислительного стресса, что может иметь место в клетках головного мозга при болезни Альцгеймера [179]. Кроме того, в клетках головного мозга при болезни Альцгеймера установлено избирательное глутатионилирование белка p53, что может способствовать развитию окислительного стресса [180].

У больных диабетом второго типа обнаружено наличие глутатионилированного гемоглобина, содержание которого коррелирует с развитием микроангиопатии [181]. В то же время в модельном эксперименте у крыс, страдающих диабетом, установлен повышенный уровень экспрессии гена Gtx1, что способствует усилению транслокации NF- κ B в ядро и повышению активности молекул клеточной адгезии ICAM-1. Оба процесса вносят существенный вклад в развитие ретинопатии. Нарушение их регуляции, важную роль в которой играет глутатионилирование, происходит при повышении активности Gtx1 [182].

В хрусталике глаза GSH содержится в высоких концентрациях (6 мМ) и в качестве антиоксиданта служит для поддержания прозрачности хрусталика [183]. При развитии катаракты соотношение GSH/GSSG снижается и белки хрусталика претерпевают структурные изменения, которые способствуют разворачиванию белковых глобул и активации ранее скрытых остатков цистеина, что ведет к повышению образования дисульфидных связей и усилению S-глутатионилирования [183]. Возможно, что поддержание уровня GSH может способствовать предотвращению и/или замедлению развития катаракты. В модельном эксперименте N-ацетилцистеин и этиловый эфир глутатиона, который легко превращается в GSH в условиях *in vivo*, успешно тормозили развитие катаракты на ранних стадиях у крыс, страдающих диабетом [184].

Глутатионилирование транскрипционного фактора p53, значительно снижает его способность связываться с молекулой ДНК. Следовательно, глутатионилирование приводит к ингибированию p53 как супрессора формирования злокачественных опухолей, что может вносить вклад в процесс онкогенеза [185]. Предполагается, что инактивация p53 через глутатионилирование обеспечивает клетке механизм адаптации, который подавляет развитие апоптотического

ответа на ранней стадии окислительного стресса и позволяет избежать немедленной гибели клетки [185].

Важно отметить, фактором риска для многих заболеваний является возраст, так как происходит накопление различных повреждений, а системы репараций снижают свою функциональную активность. С возрастом функция митохондрий также может подвергаться негативным изменениям, способствующих росту образования АФК, что наблюдается одновременно со снижением активности ферментов антиоксидантной защиты. Такие нарушения редокс-контроля приводят к изменению регуляции процесса S-глутатионилирования белков, что делает клетку более чувствительной к апоптозу и способствует развитию патологий [175].

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя вышесказанное, можно сделать вывод, что значительная роль в системе антиоксидантной защиты и редокс-зависимой регуляции принадлежит GSH и глутатион-зависимым ферментам. За последнее десятилетие выявлены принципиально новые особенности участия глутатион-зависимых ферментов (глутатионтрансферазы и глутаредоксина) в процессах пролиферации, апоптоза, фолдинга белка, клеточного сигналинга. Восстановленный глутатион (GSH) является важным внутриклеточным антиоксидантом играет особую роль в поддержании клеточного редокс-статуса за счет участия в тиол/дисульфидном обмене, что обеспечивает регуляцию целого ряда функций клетки, в том числе регуляцию генной экспрессии, активности отдельных ферментов и ферментных систем. Сохранение оптимального для клетки соотношения GSH/GSSG является существенным для ее жизнеспособности. Снижение уровня восстановленного GSH ниже показателей нормы может служить индикатором нарушения клеточного редокс-статуса и изменения редокс-зависимой регуляции генов. Нарушение внутриклеточного баланса GSH наблюдается при ряде патологий, включая злокачественные новообразования. Следствием этого нарушения являются существенные изменения в механизме клеточного редокс-зависимого сигналинга, контролируемого как неферментативно, так и ферментативно при участии изоформ глутатионтрансферазы и глутаредоксина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nagy, P. (2013) Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways, *Antioxidants & Redox Signaling*, **18**, 1623–1641.
2. Janssen-Heininger, Y.M., Nolin, J.D., Hoffman, S.M., van der Velden, J.L., Tully, J.E., Lahue, K.G., Abdalla, S.T., Chapman, D.G., Reynaert, N.L., van der Vliet, A., and Anathy, V. (2013) Emerging mechanisms of glutathione-dependent chemistry in biology and disease, *Journal of Cellular Biochemistry*, **114**, 1962–8.
3. Lu, S.C. (2013) Glutathione synthesis, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1830**, 3143–3153.
4. Franco, R., and Cidlowski, J.A. (2009) Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant, *Cell Death and Differentiation*, **16**, 1303–1314.
5. Deponte, M. (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1830**, 3217–3266.
6. Townsend, D.M., Tew, K.D., and Tapiero, H. (2003) The importance of glutathione in human disease, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **57**, 145–155.
7. Grek, C.L., Zhang, J., Manevich, Y., Danyelle, M., Townsend, D.M., and Tew, K.D. (2013) Causes and Consequences of Cysteine S-Glutathionylation, *The Journal of Biological Chemistry*, **288**, 26497–26504.
8. Board, P.G., and Menon, D. (2013) Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1830**, 3267–3288.
9. Allen, E.M., and Mielal, J.J. (2012) Protein-Thiol Oxidation and Cell Death: Regulatory Role of Glutaredoxins, *Antioxidants & Redox Signaling*, **17**, 1748–1763.
10. Lillig, C.H., and Berndt, C. (2013) Glutaredoxins in thiol/disulfide exchange, *Antioxidants & Redox Signaling*, **18**, 1654–65.
11. Green, R. M., Graham, M., O'Donovan, M. R., Chipman, J. K., and Hodges, N. J. (2006) Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity, *Mutagenesis*, **21**, 383–390.
12. Ookhtens, M., and Kaplowitz, N. (1998) Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine, *Seminars in Liver Disease*, **18**, 313–329.
13. Galano, A., and Alvarez-Idaboy, J.R. (2011) Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals, *RSC Advances*, **1**, 1763–1771.
14. Winterbourn, C.C. (1993) Superoxide as an intracellular radical sink, *Free Radical Biology and Medicine*, **14**, 85–90.
15. Ortega, A.L., Mena, S., and Estrela, J.M. (2011) Glutathione in Cancer Cell Death, *Cancers*, **3**, 1285–1310.
16. Go, Y.-M., and Jones, D.P. (2008) Redox compartmentalization in eukaryotic cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1780**, 1273–1290.
17. Jones, D.P. (2006) Redefining oxidative stress, *Antioxidants & Redox Signaling*, **8**, 1865–1879.
18. Cai, Z., and Yan, L.J. (2013) Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health, *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, **1**, 15–26.
19. Jacob, C., Battaglia, E., Burkholz, T., Peng, D., Bagrel, D., and Montanarh, M. (2012) Control of oxidative posttranslational cysteine modifications: from intricate chemistry to widespread biological and medical

- applications, *Chemical Research in Toxicology*, **25**, 588–604.
20. Rhee, S.G., Jeong, W., Chang, T.-S., and Woo, H.A. (2007) Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance, *Kidney International Supplement*, **72**, S3–S8.
 21. Fitzpatrick, A.M., Jones, D.P., and Brown, L.A. (2012) Glutathione redox control of asthma: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities, *Antioxidants & Redox Signaling*, **17**, 375–408.
 22. Fiaschi, T., Cozzi, G., Raugei, G., Formigli, L., Ramponi, G., and Chiarugi, P. (2006) Redox regulation of beta-actin during integrin-mediated cell adhesion, *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 22983–22991.
 23. Qanungo, S., Starke, D.W., Pai, H.V., Mielay, J.J., and Nieminen, A.L. (2007) Glutathione supplementation potentiates hypoxic apoptosis by S-glutathionylation of p65-NFkappaB, *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 18427–18436.
 24. Reynaert, N.L., van der Vliet, A., Guala, A.S., McGovern, T., Hristova, M., Pantano, C., Heintz, N.H., Heim, J., Ho, Y.S., Matthews, D.E., Wouters, E.F., and Janssen-Heininger, Y.M. (2006) Dynamic redox control of NF-kappaB through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory kappaB kinase beta, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 13086–13091.
 25. Lluís, J.M., Morales, A., Blasco, C., Colell, A., Mari, M., Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J.C. (2005) Critical role of mitochondrial glutathione in the survival of hepatocytes during hypoxia, *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 3224–3232.
 26. Markovic, J., Borrás, C., Ortega, A., Sastre, J., Vina, J., and Pallardo, F.V. (2007) Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation, *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 20416–20424.
 27. Garcia-Gimenez, J.L., Markovic, J., Dasi, F., Queval, G., Schnaubelt, D., Foyer, C.H., and Pallardo, F.V. (2013) Nuclear glutathione, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1830**, 3304–3316.
 28. Bellomo, G., Palladini, G., and Vairetti, M. (1997) Intranuclear distribution, function and fate of glutathione and glutathione-S-conjugate in living rat hepatocytes studied by fluorescence microscopy, *Microscopy Research and Technique*, **36**, 243–252.
 29. Ho, Y.F., and Guenther, T.M. (1994) Uptake and biosynthesis of glutathione by isolated hepatic nuclei, *Toxicologist*, **14**, 178.
 30. Voehringer, D.W., McConkey, D.J., McDonnell, T.J., Brisbay, S., and Meyn, R.E. (1998) Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 2956–2960.
 31. Zimmermann, A.K., Loucks, F.A., Schroeder, E.K., Bouchard, R.J., Tyler, K.L., and Linseman, D.A. (2007) Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria, *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 29296–29304.
 32. Carpenter, G., and Cohen, S. (1990) Epidermal growth factor, *The Journal of Biological Chemistry*, **265**, 7709–7712.
 33. Jang, J.H., and Surh, Y.J. (2003) Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function, *Biochemical Pharmacology*, **66**, 1371–1379.

34. Schafer, F.Q., and Buettner, G.R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radical Biology and Medicine*, **30**, 1191–1212.
35. Soboll, S., Gründel, S., Harris, J., Kolb-Bachofen, V., Ketterer, B., and Sies, H. (1995) The content of glutathione and glutathione S-transferases and the glutathione peroxidase activity in rat liver nuclei determined by a non-aqueous technique of cell fractionation, *The Biochemical Journal*, **311 (Pt 3)**, 889–894.
36. Conrad, M., Moreno, S.G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kölle, S., Roveri, A., Brielmeier, M., Wurst, W., Maiorino, M., and Bornkamm, G.W. (2005) The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability, *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 7637–7644.
37. Pujari, G., Berni, A., Palitti, F., and Chatterjee, A. (2009) Influence of glutathione levels on radiation-induced chromosomal DNA damage and repair in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, **675**, 23–28.
38. Berger, F., Ramirez-Hernandez, M.H., and Ziegler, M. (2004) The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P), *Trends in Biochemical Sciences*, **29**, 111–118.
39. Pellny, T.K., Locato, V., Vivancos, P.D., Markovic, J., De Gara, L., Pallardo, F.V., and Foyer, C.H. (2009) Pyridine nucleotide cycling and control of intracellular redox state in relation to poly (ADP-ribose) polymerase activity and nuclear localization of glutathione during exponential growth of Arabidopsis cells in culture, *Molecular Plant*, **2**, 442–456.
40. García-Giménez, J.L., Ledesma, A.M., Esmoris, I., Romá-Mateo, C., Sanz, P., Viña, J., and Pallardó, F.V. (2012) Histone carbonylation occurs in proliferating cells, *Free Radical Biology and Medicine*, **52**, 1453–1464.
41. Cadenas, E., and Davies, K.J. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, *Free Radical Biology and Medicine*, **29**, 222–230.
42. Mari, M., Morales, A., Colell, A., Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J.C. (2009) Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant, *Antioxidants & Redox Signaling*, **11**, 2685–2700.
43. Cole-Ezea, P., Swan, D., Shanley, D., and Hesketh, J. (2012) Glutathione peroxidase 4 has a major role in protecting mitochondria from oxidative damage and maintaining oxidative phosphorylation complexes in gut epithelial cells, *Free Radical Biology and Medicine*, **53**, 488–497.
44. Liang, H., Ran, Q., Jang, Y.C., Holstein, D., Lechleiter, J., McDonald-Marsh, T., Musatov, A., Song, W., Van Remmen, H., and Richardson, A. (2009) Glutathione peroxidase 4 differentially regulates the release of apoptogenic proteins from mitochondria, *Free Radical Biology and Medicine*, **47**, 312–320.
45. Mari, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., Kaplowitz, N., and Fernández-Checa, J.C. (2013) Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1830**, 3317–3328.
46. Johansson, C., Lillig, C.H., and Holmgren, A. (2004) Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase, *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 7537–7543.
47. Knoops, B., Goemaere, J., Van der Eecken, V., and Declercq, J.P. (2011)

- Peroxiredoxin 5: structure, mechanism, and function of the mammalian atypical 2-Cys peroxiredoxin, *Antioxidants & Redox Signaling*, **15**, 817–829.
48. Zhang, H., Go, Y.M., and Jones, D.P. (2007) Mitochondrial thioredoxin-2/ peroxiredoxin-3 system functions in parallel with mitochondrial GSH system in protection against oxidative stress, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **465**, 119–126.
 49. Taylor, E.R., Hurrell, F., Shannon, R.J., Lin, T.K., Hirst, J., and Murphy, M.P. (2003) Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation, *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 19603–19610.
 50. Beer, S. M., Taylor, E. R., Brown, S. E., Dahm, C. C., Costa, N. J., Runswick, M. J., and Murphy, M. P. (2004) Glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of mitochondrial membrane thiol proteins: implications for mitochondrial redox regulation and antioxidant DEFENSE, *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 47939–47951.
 51. Hurd, T.R., Requejo, R., Filipovska, A., Brown, S., Prime, T.A., Robinson, A.J., Fearnley, I.M., and Murphy, M.P. (2008) Complex I within oxidatively stressed bovine heart mitochondria is glutathionylated on Cys-531 and Cys-704 of the 75-kDa subunit: potential role of CYS residues in decreasing oxidative damage, *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 24801–24815.
 52. Mailloux, R.J., Jin, X., and Willmore, W.G. (2013) Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions, *Redox Biology*, **2**, 123–139.
 53. Tretter, L., and Adam-Vizi, V. (2000) Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress, *The Journal of Neuroscience*, **20**, 8972–8979.
 54. Gibson, G.E., Park, L.C., Sheu, K.F., Blass, J.P., and Calingasan, N.Y. (2000) The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegeneration, *Neurochemistry International*, **36**, 97–112.
 55. Cazanave, S., Berson, A., Haouzi, D., Vadrot, N., Fau, D., Grodet, A., Lettéron, P., Feldmann, G., El-Benna, J., Fromenty, B., Robin, M.A., and Pessayre, D. (2007) High hepatic glutathione stores alleviate Fas-induced apoptosis in mice, *Journal of Hepatology*, **46**, 858–868.
 56. Aoyama, K., Watabe, M., and Nakaki, T. (2012) Modulation of neuronal glutathione synthesis by EAAC1 and its interacting protein GTRAP3-18, *Amino Acids*, **42**, 163–169.
 57. Thompson, J.A., and Franklin, C.C. (2009) Enhanced glutathione biosynthetic capacity promotes resistance to As3+-induced apoptosis, *Toxicology Letters*, **193**, 33–40.
 58. Pias, E.K., and Aw, T.Y. (2002) Early redox imbalance mediates hydroperoxide-induced apoptosis in mitotic competent undifferentiated PC-12 cells, *Cell Death and Differentiation*, **9**, 1007–1016.
 59. Pias, E.K., and Aw, T.Y. (2002) Apoptosis in mitotic competent undifferentiated cells is induced by cellular redox imbalance independent of reactive oxygen species production, *FASEB Journal*, **16**, 781–790.
 60. Wang, T.G., Gotoh, Y., Jennings, M.H., Rhoads, C.A., and Aw, T.Y. (2000) Lipid hydroperoxide-induced apoptosis in human colonic CaCo-2 cells is associated with an early loss of cellular redox balance, *FASEB Journal*, **14**, 1567–1576.
 61. Ekshyyan, O., and Aw, T.Y. (2005) Decreased susceptibility of differentiated PC12 cells to oxidative chal-

- lenge: relationship to cellular redox and expression of apoptotic protease activator factor-1, *Cell Death and Differentiation*, **12**, 1066–1077.
62. Okouchi, M., Okayama, N., and Aw, T.Y. (2005) Differential susceptibility of naive and differentiated PC-12 cells to methylglyoxal-induced apoptosis: influence of cellular redox, *Current Neurovascular Research*, **2**, 13–22.
63. Runchel, C., Matsuzawa, A., and Ichijo, H. (2011) Mitogen-activated protein kinases in mammalian oxidative stress responses, *Antioxidants & Redox Signaling*, **15**, 205–218.
64. Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation, *Physiological Reviews*, **81**, 807–869.
65. Circu, M.L., and Aw, T.Y. (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free Radical Biology and Medicine*, **48**, 749–762.
66. Lu, G.D., Shen, H.M., Chung, M.C., and Ong, C.N. (2007) Critical role of oxidative stress and sustained JNK activation in aloe-emodin-mediated apoptotic cell death in human hepatoma cells, *Carcinogenesis*, **28**, 1937–1945.
67. Cuadrado, A., Garcia-Fernandez, L.F., Gonzalez, L., Suarez, Y., Losada, A., Alcaide, V., Martinez, T., Fernandez-Sousa, J.M., Sanchez-Puelles, J.M., and Munoz, A. (2003) Aplidin induces apoptosis in human cancer cells via glutathione depletion and sustained activation of the epidermal growth factor receptor, Src, JNK, and p38 MAPK, *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, P. 241–250.
68. Ji, L., Shen, K., Jiang, P., Morahan, G., Wang, Z. (2011) Critical roles of cellular glutathione homeostasis and jnk activation in andrographolide-mediated apoptotic cell death in human hepatoma cells, *Molecular Carcinogenesis*, **50**, P. 580–591.
69. Filomeni, G., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. (2003) Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway, *FASEB Journal*, **17**, 64–66.
70. Filomeni, G., Aquilano, K., Civitareale, P., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. (2005) Activation of c-Jun-N-terminal kinase is required for apoptosis triggered by glutathione disulfide in neuroblastoma cells, *Free Radical Biology and Medicine*, **39**, 345–354.
71. Piccirillo, S., Filomeni, G., Brune, B., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. (2009) Redox mechanisms involved in the selective activation of Nrf2-mediated resistance versus p53-dependent apoptosis in adenocarcinoma cells, *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 27721–27733.
72. Filomeni, G., Piccirillo, S., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. (2012) p38(MAPK) and ERK1/2 dictate cell death/survival response to different pro-oxidant stimuli via p53 and Nrf2 in neuroblastoma cells SH-SY5Y, *Biochemical Pharmacology*, **83**, 1349–1357.
73. Cross, J.V., and Templeton, D.J. (2004) Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain, *The Biochemical Journal*, **381**, 675–683.
74. Ghosh, S., Pulinilkunnil, T., Yuen, G., Kewalramani, G., An, D., Qi, D., Abrahani, A., and Rodrigues, B. (2005) Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion, *American Journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology*, **289**, H768–H776.
75. Armstrong, J.S., Steinauer, K.K., Hornung, B., Irish, J.M., Lecane, P., Birrell, G.W., Peehl, D.M., and Knox, S.J. (2002) Role of glutathione

- depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line, *Cell Death and Differentiation*, **9**, 252–263.
76. Mari, M., Colell, A., Morales, A., Caballero, F., Moles, A., Fernandez, A., Terrones, O., Basanez, G., Antonsson, B., Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J.C. (2008) Mechanism of mitochondrial glutathione-dependent hepatocellular susceptibility to TNF despite NF-kappaB activation, *Gastroenterology*, **134**, 1507–1520.
77. Circu, M.L., Rodriguez, C., Maloney, R., Moyer, M.P., and Aw, T.Y. (2008) Contribution of mitochondrial GSH transport to matrix GSH status and colonic epithelial cell apoptosis, *Free Radical Biology and Medicine*, **44**, 768–778.
78. Martins, N.M., Santos, N.A., Curti, C., Bianchi, M.L., and Santos, A.C. (2008) Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver, *Journal of Applied Toxicology*, **28**, 337–344.
79. Santos, N.A., Catao, C.S., Martins, N.M., Curti, C., Bianchi, M.L., and Santos, A.C. (2007) Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria, *Archives of Toxicology*, **81**, 495–504.
80. Chen, G., Chen, Z., Hu, Y., and Huang, P. (2011) Inhibition of mitochondrial respiration and rapid depletion of mitochondrial glutathione by beta-phenethyl isothiocyanate: mechanisms for anti-leukemia activity, *Antioxidants & Redox Signaling*, **15**, 2911–2921.
81. Chernyak, B.V., and Bernardi, P. (1996) The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites, *European Journal of Biochemistry*, **238**, 623–630.
82. Costantini, P., Chernyak, B.V., Petronilli, V., and Bernardi, P. (1996) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites, *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 6746–6751.
83. Aon, M.A., Cortassa, S., Maack, C., and O'Rourke, B. (2007) Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutathione redox thiol status, *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 21889–21900.
84. Wu, B., and Dong, D. (2012) Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery, *Trends in Pharmacological Sciences*, **33**, 656–668.
85. Hayes, J.D., Flanagan, J.U., and Jowsey, I.R. (2005) Glutathione transferases, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **45**, 51–88.
86. Tew, K.D., and Townsend, D.M. (2012) Glutathione-S-transferases as determinants of cell survival and death, *Antioxidants & Redox Signaling*, **17**, 1728–1737.
87. Кулинский, В.И. (1999) Обезвреживание ксенобиотиков, *Соросовский образовательный журнал*, **1**, 8–12.
88. Krajewski, M.P., Kanawati, B., Fekete, A., Kowalski, N., Schmitt-Kopplin, P., and Grill, E. (2013) Analysis of Arabidopsis glutathione transferases in yeast, *Phytochemistry*, **91**, 198–207.
89. Ladner, J.E., Parsons, J.F., Rife, C.L., Gilliland, G.L., and Armstrong, R.N. (2004) Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1, *Biochemistry*, **43**, 352–361.

90. Jakobsson, P.-J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., and Persson, B. (1999) Common structural features of MAPEG – a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism, *Protein Science*, **8**, 689–692.
91. Morel, F., and Aninat, C. (2011) The glutathione transferase kappa family, *Drug Metabolism Reviews*, **43**, 281–291.
92. Mandal, A.K., Skoch, J., Bacshai, B.J., Hyman, B.T., Christmas, P., Miller, D., Yamin, T.T., Xu, S., Wisniewski, D., Evans, J.F., and Soberman, R.J. (2004) The membrane organization of leukotriene synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 6587–6592.
93. Oakley, A. (2011) Glutathione transferases: a structural perspective, *Drug Metabolism Reviews*, **43**, 138–151.
94. Prabhu, K.S., Reddy, P.V., Jones, E.C., Liken, A.D., and Reddy, C.C. (2004) Characterization of a class alpha glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **424**, 72–80.
95. Hiratsuka, A., Yamane, H., Yamazaki, S., Ozawa, N., and Watabe, T. (1997) Subunit Ya-specific glutathione peroxidase activity toward cholesterol 7-hydroperoxides of glutathione S-transferases in cytosols from rat liver and skin, *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 4763–4769.
96. Hubatsch, I., Ridderstrom, M., Mannervik, B. (1998) Human glutathione transferase A4-4: an Alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation, *The Biochemical Journal*, **330**, 175–179.
97. Dagnino-Subiabre, A., Cassels, B.K., Baez, S., Johansson, A.S., Mannervik, B., and Segura-Aguilar, J. (2000) Glutathione transferase M2-2 catalyzes conjugation of dopamine and dopa o-quinones, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **274**, 32–36.
98. Manevich, Y., Feinstein, S., and Fisher, A.B. (2004) Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 3780–3785.
99. Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S.Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K.D., Pincus, M.R., Sardana, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Davis, R.J., and Ronai, Z. (1999) Regulation of JNK signaling by GSTp, *The EMBO Journal*, **18**, 1321–1334.
100. Wu, Y., Fan, Y., Xue, B., Luo, L., Shen, J., Zhang, S., Jiang, Y., and Yin, Z. (2006) Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals, *Oncogene*, **25**, 5787–5800.
101. Sharma, A., Patrick, B., Li, J., Sharma, R., Jeyabal, P.V., Reddy, P.M., Awasthi, S., Awasthi, Y.C. (2006) Glutathione S-transferases as antioxidant enzymes: small cell lung cancer (H69) cells transfected with hGSTA1 resist doxorubicin-induced apoptosis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **452**, 165–173.
102. Dorion, S., Lambert, H., and Landry, J. (2002) Activation of the p38 signaling pathway by heat shock involves the dissociation of glutathione S-transferase Mu from Ask1, *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 30792–30797.

103. Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., and Gotoh, Y. (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways, *Science*, **275**, 90–94.
104. Lindahl, M., Mata-Cabana, A., and Kieselbach, T. (2011) The disulfide proteome and other reactive cysteine proteomes: analysis and functional significance, *Antioxidants & Redox Signaling*, **14**, 2581–2642.
105. Townsend, D.M., Manevich, Y., He, L., Hutchens, S., Pazoles, C.J., and Tew, K.D. (2009) Novel role for glutathione S-transferase pi. Regulator of protein S-Glutathionylation following oxidative and nitrosative stress, *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 436–445.
106. Ralat, L.A., Misquitta, S.A., Manevich, Y., Fisher, A.B., and Colman, R.F. (2008) Characterization of the complex of glutathione S-transferase pi and l-cysteine peroxiredoxin, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **474**, 109–118.
107. Pettigrew, N.E., and Colman, R.F. (2001) Heterodimers of glutathione S-transferase can form between isoenzyme, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **396**, 225–230.
108. Tew, K.D., Manevich, Y., Grek, C., Xiong, Y., Uys, J., and Townsend, D.M. (2011) The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer, *Free Radical Biology and Medicine*, **51**, 299–313.
109. Ralat, L.A., Manevich, Y., Fisher, A.B., and Colman R.F. (2006) Direct evidence for the formation of a complex between l-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes, *Biochemistry*, **45**, 360–372.
110. Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **13**, 251–262.
111. Klaus, A., Zorman, S., Berthier, A., Polge, C., Ramirez, S., Michelland, S., Sève, M., Vertommen, D., Rider, M., Lentze, N., Auerbach, D., and Schlattner, U. (2013) Glutathione S-transferases interact with AMP-activated protein kinase: evidence for S-glutathionylation and activation in vitro, *PLoS One*, **8**, e62497.
112. Oakhill, J.S., Chen, Z.P., Scott, J.W., Steel, R., Castelli, L.A., Ling, N., Macaulay, S.L., and Kemp, B.E.. (2010) β -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMPactivated protein kinase (AMPK), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 19237–19241.
113. Zmijewski, J.W., Banerjee, S., Bae, H., Friggeri, A., Lazarowski, E.R., and Abraham, E. (2010) Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase, *The Journal of Biological Chemistry*, **285**, 33154–33164.
114. Hawley, S.A., Ross, F.A., Chevtzoff, C., Green, K.A., Evans, A., Fogarty, S., Towler, M.C., Brown, L.J., Ogunbayo, O.A., Evans, A.M., and Hardie, D.G. (2010) Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation, *Cell Metabolism*, **11**, 554–565.
115. Zou, M.H., Kirkpatrick, S.S., Davis, B.J., Nelson, J.S., Wiles, W.G., Schlattner, U., Neumann, D., Brownlee, M., Freeman, M.B.,

- and Goldman, M.H. (2004) Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species, *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 43940–43951.
116. Xie, Z., Dong, Y., Zhang, M., Cui, M.Z., Cohen, R.A., Riek, U., Neumann, D., Schlattner, U., and Zou, M.H. (2006) Activation of protein kinase C zeta by peroxynitrite regulates LKB1-dependent AMP-activated protein kinase in cultured endothelial cells, *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 6366–6375.
117. Tikhonovich, I., Cox, J., and Weinman, S.A. (2013) Forkhead box class O transcription factors in liver function and disease, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **28** Suppl. 1, 125–131.
118. Colombo, S.L., and Moncada, S. (2009) AMPK α 1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells, *The Biochemical Journal*, **421**, 163–169.
119. Wang, S., Dale, G.L., Song, P., Viollet, B., and Zou, M.H. (2010) AMPK α 1 deletion shortens erythrocyte life span in mice: role of oxidative stress, *The Journal of Biological Chemistry*, **285**, 19976–19985.
120. Gree, E.L., Oskoui, P.R., Banko, M.R., Maniar, J.M., Gygi, M.P., Gygi, S.P., and Brunet, A. (2007) The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor, *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 30107–30119.
121. Xie, Z., Zhang, J., Wu, J., Viollet, B., and Zou, M.H. (2008) Upregulation of mitochondrial uncoupling protein-2 by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells attenuates oxidative stress in diabetes, *Diabetes*, **57**, 3222–3230.
122. Usatyuk, P.V., and Natarajan, V. (2004) Role of mitogen-activated protein kinases in 4-hydroxy-2-nonenal-induced actin remodeling and barrier function in endothelial cells, *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 11789–11797.
123. Zarkovic, N., Ilic, Z., Jurin, M., Schaur, R.J., Puhl, H., and Esterbauer, H. (1993) Stimulation of HeLa cell growth by physiological concentrations of 4-hydroxynonenal, *Cell Biochemistry and Function*, **11**, 279–286.
124. Pizzimenti, S., Barrera, G., Dianzani, M.U., and Brüsselbach, S. (1999) Inhibition of D1, D2, and A-cyclin expression in HL-60 cells by the lipid peroxydation product 4-hydroxynonenal, *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1578–1586.
125. Barrera, G., Pizzimenti, S., Laurora, S., Moroni, E., Giglioni, B., Dianzani, M.U. (2002) 4-Hydroxynonenal affects pRb/E2F pathway in HL-60 human leukemic cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **295**, 267–275.
126. He, N.G., Singhal, S.S., Srivastava, S.K., Zimniak, P., Awasthi, Y.C., and Awasthi, S. (1996) Transfection of a 4-hydroxynonenal metabolizing glutathione S-transferase isozyme, mouse GSTA4-4, confers doxorubicin resistance to Chinese hamster ovary cells, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **333**, 214–220.
127. Gallagher, E.P., Gardner, J.L., and Barber, D.S. (2006) Several glutathione S-transferase isozymes that protect against oxidative injury are expressed in human liver mitochondria, *Biochemical Pharmacology*, **71**, 1619–1628.
128. Gallagher, E.P., and Gardner, J.L. (2002) Comparative expression of two alpha class glutathione S-transferases in human adult and prenatal

- liver tissues, *Biochemical Pharmacology*, **63**, 2025–2036.
129. Raza, H. (2011) Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease, *The FEBS Journal*, **278**, 4243–4251.
130. Desmots, F., Rissel, M., Gilot, D., Lagadic-Gossmann, D., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A., and Loyer, P. (2002) Pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 and survival factor epidermal growth factor positively regulate the murine GSTA4 enzyme in hepatocytes, *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 17892–17900.
131. Curtis, J.M., Grimsrud, P.A., Wright, W.S., Xu, X., Foncea, R.E., Graham, D.W., Brestoff, J.R., Wiczer, B.M., Ilkayeva, O., Cianflone, K., Muoio, D.E., Arriaga, E.A., and Bernlohr, D.A. (2010) Downregulation of adipose glutathione S-transferase A4 leads to increased protein carbonylation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction, *Diabetes*, **59**, 1132–1142.
132. Hyman, S.E., Malenka, R.C., Nestler, E.J. (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory, *Annual Review of Neuroscience*, **29**, 565–598.
133. Kalivas, P.W., and O'Brien, C. (2008) Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity, *Neuropsychopharmacology*, **33**, 166–180.
134. Klatt, P., and Lamas, S. (2002) c-Jun regulation by S-glutathionylation, *Methods in Enzymology*, **348**, 157–174.
135. Humphries, K.M., Deal, M.S., and Taylor, S.S. (2005) Enhanced dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase by oxidation and thiol modification, *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 2750–2758.
136. Uys, J.D., Knackstedt, L., Hurt, P., Tew, K.D., Manevich, Y., Hutchens, S., Townsend, D.M., and Kalivas, P.W. (2011) Cocaine-induced adaptations in cellular redox balance contributes to enduring behavioral plasticity, *Neuropsychopharmacology*, **36**, 2551–2560.
137. Sun, K.H., Chang, K.H., Clawson, S., Ghosh, S., Mirzaei, H., Regnier, F., and Shah, K. (2011) Glutathione-S-transferase P1 is a critical regulator of Cdk5 kinase activity, *Journal of Neurochemistry*, **118**, 902–914.
138. Castro-Caldas, M., Carvalho, A.N., Rodrigues, E., Henderson, C., Wolf, C.R., and Gama, M.J. (2012) Glutathione S-transferase pi mediates MPTP-induced c-Jun N-terminal kinase activation in the nigrostriatal pathway, *Molecular Neurobiology*, **45**, 466–477.
139. McIlwain, C.C., Townsend, D.M., and Tew, K.D. (2006) Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy, *Oncogene*, **25**, 1639–1648.
140. Davis, Jr. W., Ronai, Z., and Tew, K.D. (2001) Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **296**, 1–6.
141. Hayes, J.D., and Pulford, D.J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **30**, 445–600.
142. Higgins, L.G., and Hayes, J.D. (2011) Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by

- xenobiotics and pro-inflammatory agents, *Drug Metabolism Reviews*, **43**, 92–137.
143. Pool-Zobel, B., Veeriah, S., and Böhmer, F.D. (2005) Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens – focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis, *Mutation Research*, **591**, 74–92.
144. McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. (2006) Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a «tethering» mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex, *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 24756–24768.
145. Alves, R., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., and Herrero, E. (2009) Evolution based on domain combinations: the case of glutaredoxins, *BMC Evolutionary Biology*, **9**, artical 66.
146. Rouhier, N. (2010) Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly, *The New Phytologist*, **186**, 365–372.
147. Lillig, C.H., Berndt, C., and Holmgren, A. (2008) Glutaredoxin systems, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1780**, 1304–1317.
148. Johansson, C., Roos, A.K., Montano, S.J., Sengupta, R., Filippakopoulos, P., Guo, K., von Delft, F., Holmgren, A., Oppermann, U., and Kavanagh, K.L. (2011) The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity, *The Biochemical Journal*, **433**, 303–311.
149. Couturier, J., Jacquot, J.P., and Rouhier, N. (2009) Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **66**, 2539–2557.
150. Benyamina, S.M., Baldacci-Cresp, F., Couturier, J., Chibani, K., Hopkins, J., Bekki, A., de Lajudie, P., Rouhier, N., Jacquot, J.P., Alloing, G., Puppo, A., and Frendo, P. (2013) Two *Sinorhizobium meliloti* glutaredoxins regulate iron metabolism and symbiotic bacteroid differentiation, *Environmental Microbiology*, **15**, 795–810.
151. Xing, S., Lauri, A., and Zachgo, S. (2006) Redox regulation and flower development: a novel function for glutaredoxins, *Plant Biology*, **8**, 547–555.
152. Hanschmann, E.M., Godoy, J.R., Berndt, C., Hudemann, C., and Lillig, C.H. (2013) Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins – molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling, *Antioxidants & Redox Signaling*, **19**, 1539–1605.
153. Lundberg, M., Fernandes, A.P., Kumar, S., and Holmgren, A. (2004) Cellular and plasma levels of human glutaredoxin 1 and 2 detected by sensitive ELISA systems, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **319**, 801–809.
154. Lönn, M.E., Hudemann, C., Berndt, C., Cherkasov, V., Capani, F., Holmgren, A., and Lillig, C.H. (2008) Expression pattern of human glutaredoxin 2 isoforms: identification and characterization of two testis/cancer cell-specific isoforms, *Antioxidants & Redox Signaling*, **10**, 547–557.
155. Gallogly, M.M., Starke, D.W., and Mieyal, J.J. (2009) Mechanistic and Kinetic Details of Catalysis of Thiol-Disulfide Exchange by Glutaredoxins and Potential Mechanisms of Regulation, *Antioxidants & Redox Signaling*, **11**, 1059–1081.

156. Stroher, E., and Millar, A.H. (2012) The biological roles of glutaredoxins, *The Biochemical Journal*, **446**, 333–348.
157. Watson, W.H., Chen, Y., and Jones, D.P. (2003) Redox state of glutathione and thioredoxin in differentiation and apoptosis, *Biofactors*, **17**, 307–314.
158. Aslund, F., Berndt, K.D., and Holmgren, A. (1997) Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria, *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 30780–30786.
159. Starke, D.W., Chock, P.B., and Mieyal, J.J. (2003) Glutathione-thiyl radical scavenging and transferase properties of human glutaredoxin (thioltransferase). Potential role in redox signal transduction, *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 14607–14613.
160. Ruoppolo, M., Lundstrom-Ljung, J., Talamo, F., Pucci, P., and Marino, G. (1997) Effect of glutaredoxin and protein disulfide isomerase on the glutathione-dependent folding of ribonuclease A, *Biochemistry*, **36**, 12259–12267.
161. Lillig, C. H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lonn, M. E., Hudemann, C., Bill, E., and Holmgren, A. (2005) Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 8168–8173.
162. Riondet, C., Desouris, J. P., Montoya, J. G., Chartier, Y., Meyer, Y., and Reichheld, J.-P. (2012) A dicotyledon-specific glutaredoxin GRXC1 family with dimer-dependent redox regulation is functionally redundant with GRXC2, *Plant, Cell & Environment*, **35**, 360–373.
163. Feng, Y. G., Zhong, N., Rouhier, N., Hase, T., Kusunoki, M., Jacquot, J. P., Jin, C. W., and Xia, B. (2006) Structural insight into poplar glutaredoxin C1 with a bridging iron-sulfur cluster at the active site, *Biochemistry*, **45**, 7998–8008.
164. Berndt, C., Hudemann, C., Hanschmann, E.-M., Axelsson, R., Holmgren, A., and Lillig C.H. (2007) How does iron-sulfur cluster coordination regulate the activity of human glutaredoxin 2?, *Antioxidants & Redox Signaling*, **9**, 151–157.
165. Mitra, S., and Elliott, S.J. (2009) Oxidative disassembly of the [2Fe-2S] cluster of human Grx2 and redox regulation in the mitochondria, *Biochemistry*, **48**, 3813–3815.
166. Johansson, C., Kavanagh, K.L., Gileadi, O., and Oppermann, U. (2007) Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria, *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 3077–3082.
167. Zhang, H., Du, Y., Zhang, X., Lu, J., and Holmgren A. (2014) Glutaredoxin 2 Reduces Both Thioredoxin 2 and Thioredoxin 1 and Protects Cells from Apoptosis Induced by Auranofin and 4-Hydroxynonenal, *Antioxidants & Redox Signaling*, in press.
168. Muhlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J.R., Uzarska, M.A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., Lillig, C.H., and Lill, R. (2010) Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster, *Cell Metabolism*, **12**, 373–385.
169. Linares, G.R., Xing, W., Govoni, K.E., Chen, S.T., and Mohan, S. (2009) Glutaredoxin 5 regulates

- osteoblast apoptosis by protecting against oxidative stress, *Bone*, **44**, 795–804.
170. Xia, T.H., Bushweller, J.H., Sodano, P., Billeter, M., Bjornberg, O., Holmgren, A., and Wuthrich, K. (1992) NMR structure of oxidized *Escherichia coli* glutaredoxin: comparison with reduced *E. coli* glutaredoxin and functionally related proteins, *Protein Science*, **1**, 310–321.
171. Wang, Y., Amegbey, G., and Wishart, D.S. (2004) Solution structures of reduced and oxidized bacteriophage T4 glutaredoxin, *Journal of Biomolecular NMR*, **29**, 85–90.
172. Bushweller, J.H., Billeter, M., Holmgren, A., and Wuthrich, K. (1994) The nuclear magnetic resonance solution structure of the mixed disulfide between *Escherichia coli* glutaredoxin(C14S) and glutathione, *Journal of Molecular Biology*, **235**, 1585–1597.
173. Anathy, V., Aesif, S.W., Guala, A.S., Havermans, M., Reynaert, N.L., Ho, Y.S., Budd, R.C., and Janssen-Heininger, Y.M. (2009) Redox amplification of apoptosis by caspase-dependent cleavage of glutaredoxin 1 and S-glutathionylation of Fas, *The Journal of Cell Biology*, **184**, 241–252.
174. Huang, Z., Pinto, J.T., Deng, H., and Richie J.P.Jr. (2008) Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation, *Biochemical Pharmacology*, **75**, 2234–2244.
175. Allen, E.M., Mieyal, J.J. (2012) Protein–thiol oxidation and cell death: regulatory role of glutaredoxins, *Antioxidants & Redox Signaling*, **17**, 1748–1763
176. Song, J.J., Rhee, J.G., Suntharalingam, M., Walsh, S.A., Spitz, D.R., and Lee, Y.J. (2002) Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H₂O₂, *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 46566–46575.
177. Sparaco, M., Gaeta, L.M., Santorelli, F.M., Passarelli, C., Tozzi, G., Bertini, E., Simonati, A., Scaravilli, F., Taroni, F., Duyckaerts, C., Felleppa, M., and Piemonte, F. (2009) Friedreich's ataxia: oxidative stress and cytoskeletal abnormalities, *Journal of the Neurological Sciences*, **287**, 111–118.
178. Johansson, M., and Lundberg, M. (2007) Glutathionylation of beta-actin via a cysteinyl sulfenic acid intermediary, *BMC Biochemistry*, **8**, 26.
179. Shi, Q., Xu, H., Kleinman, W.A., and Gibson, G.E. (2008) Novel functions of the α -ketoglutarate dehydrogenase complex may mediate diverse oxidant-induced changes in mitochondrial enzymes associated with Alzheimer's disease, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1782**, 229–238.
180. Di Domenico, F., Cenini, G., Sultana, R., Perluigi, M., Uberti, D., Memo, M., and Butterfield, D.A. (2009) Glutathionylation of the pro-apoptotic protein p53 in Alzheimer's disease brain: implications for AD pathogenesis, *Neurochemical Research*, **34**, 727–733.
181. Sampathkumar, R., Balasubramanyam, M., Sudarshala, S., Rema, M., Mohan, V., and Balaram, P. (2005) Increased glutathionylated hemoglobin (HbSSG) in type 2 diabetes subjects with microangiopathy, *Clinical Biochemistry*, **38**, 892–899.
182. Shelton, M.D., Kern, T.S., and Mieyal, J.J. (2007) Glutaredoxin regulates nuclear factor κ -B and intercellular adhesion molecule in Müller cells: model of diabetic retinopathy, *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 12467–12474.

183. Craghill, J., Cronshaw, A.D., and Harding, J.J. (2004) The identification of a reaction site of glutathione mixeddisulphide formation on γ S-crystallin in human lens, *The Biochemical Journal*, **379**, 595–600.
184. Zhang, S., Chai, F.Y., Yan, H., Guo, Y., and Harding, J.J. (2008) Effects of N-acetylcysteine and glutathione ethyl ester drops on streptozotocin-induced diabetic cataract in rats, *Molecular Vision*, **14**, 862–870.
185. Velu, C.S., Niture, S.K., Doneanu, C.E., Pattabiraman, N., and Srivenugopal, K.S. (2007) Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-binding domain during oxidative stress, *Biochemistry*, **46**, 7765–7780.