

Received: 25.03.2020
Accepted: 09.11.2020
Published: 26.01.2021

Regulacja układu zależnego od tioredoksyny jako element farmakoterapii w chorobach z zaburzeniami równowagi redoks

Regulation of the thioredoxin-dependent system as an element of pharmacotherapy in redox-impaired diseases

Anna Jastrząb, Elżbieta Skrzydlewska

Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Streszczenie:

Działanie wielu czynników egzogennych, a także zaburzone procesy metaboliczne komórek przyczyniają się do nasilonego wytwarzania oksydantów, a to zaburza równowagę redoks, wywołując zmiany metaboliczne, w tym śmierci lub transformacji nowotworowej komórek. Jednak każda komórka zawiera antyoksydanty, które mają zapobiegać tego typu sytuacjom. Jednym z układów antyoksydacyjnych, funkcjonujących w komórkach, jest układ zależny od tioredoksyny, w skład którego wchodzi: tioredoksyna (Trx), reduktaza tioredoksyny (TrxR) oraz peroksydaza tioredoksyny (TPx), które mogą redukować utlenione składniki komórek kosztem fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH). Działanie takie wynika z budowy przestrzennej Trx oraz TrxR, która umożliwia wytworzenie wewnątrzcząsteczkowego mostka disulfidowego w obrębie cząsteczki tioredoksyny oraz dwóch międzycząsteczkowych mostków selenosulfidowych w obrębie dimeru reduktazy tioredoksyny. Inną, równie istotną funkcją układu zależnego od tioredoksyny jest regulowanie ekspresji wielu białek za pośrednictwem takich czynników jak czynnik transkrypcyjnego NF- κ B oraz kinaza regulująca apoptozę (ASK-1), które uruchamiają kaskady przemian metabolicznych prowadzących ostatecznie do proliferacji lub apoptozy komórek. Wzrost ekspresji/aktywności składników systemu zależnego od Trx obserwuje się w rozwoju wielu nowotworów. Dlatego też poszukiwanie selektywnych inhibitorów tioredoksyny lub reduktazy tioredoksyny jest obecnie jednym z głównych kierunków badań w farmakoterapii nowotworów. Wykazano, że wiele naturalnie występujących związków polifenolowych pochodzenia naturalnego o działaniu antyoksydacyjnym (np. kwercetyna czy kurkumina) powoduje inaktywację układu Trx-TrxR. Jednocześnie wiele syntetycznych związków, w tym związki kompleksowe, które stosowane są w terapii przeciwnowotworowej (np. cisplatyna, auranofina, moteksafina gadolinu), również hamują działanie układu zależnego od Trx.

Słowa kluczowe:

tioredoksyna, reduktaza tioredoksyny, stres oksydacyjny, inhibitory

Summary:

The action of many exogenous factors as well as disturbed metabolic processes of cells contribute to the increased production of oxidants, which leads to redox imbalance and, as a consequence, metabolic changes, including death or tumor transformation of cells. However, each cell is equipped with antioxidants to prevent this type of situation. One of the antioxidant systems functioning in cells is the thioredoxin dependent system, which includes thioredoxin (Trx), thioredoxin reductase (TrxR) and thioredoxin peroxidase (TPx), which have the ability to reduce oxidized forms of cell components at the expense of nicotinamidoadenine dinucleotide phosphate (NADPH). This effect results from the spatial structure of Trx and TrxR, which allows the formation of an intramolecular disulfide bridge within the thioredoxin molecule and two intermolecular selenosulfide bridges within the thioredoxin

reductase dimer. Another, equally important function of the thioredoxin-dependent system is to regulate the expression of many proteins through factors such as NFκB transcription factor and apoptosis regulating kinase (ASK-1), which trigger cascades of metabolic transformations ultimately leading to cell proliferation or apoptosis. The increase in expression/activity of Trx-dependent system components is observed in the development of many cancers. Therefore, the search for selective thioredoxin or thioredoxin reductase inhibitors is currently one of the main research directions in cancer pharmacotherapy. It has been shown that many naturally occurring polyphenolic compounds of natural origin with antioxidant activity (e.g. quercetin or curcumin) inactivate the Trx-dependent system. At the same time, a number of synthetic compounds, including complex compounds, that are used in cancer therapy (e.g. cisplatin, auranofin, gadolinium motexafin) also inhibit the action of the thioredoxin system.

Keywords: thioredoxin, thioredoxin reductase, oxidative stress, inhibitors

GICID: 01.3001.0014.6952
DOI: 10.5604/01.3001.0014.6952
Word count: 7 482
Tables: 1
Figures: 6
References: 93

Adres autorki: prof. dr hab. Elżbieta Skrzydlewska, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku; Euroregionalne Centrum Farmacji, ul. Mickiewicza 2D, 15-222 Białystok, e-mail: elzbieta.skrzydlewska@umb.edu.pl

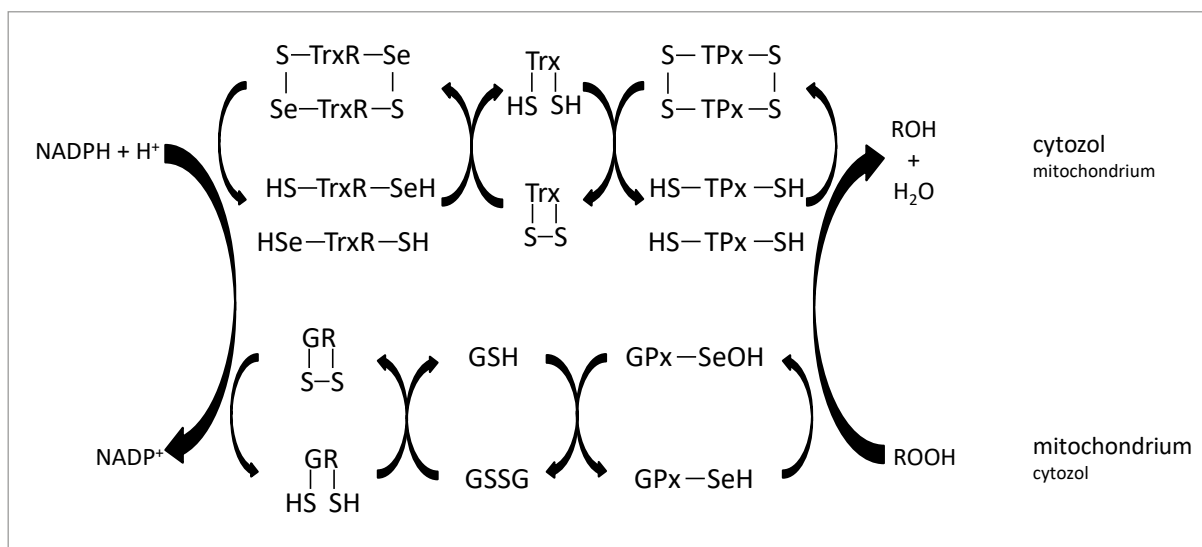
Wykaz skrótów: **Ala** – alanina; **AP-1** – czynnik transkrypcyjny (activator protein 1); **ASK-1** – kinaza regulująca apoptozę 1 (apoptosis signal-regulating kinase 1); **Asp** – kwas asparaginowy; **Asn** – asparagina; **Bax** – białko przyspieszające apoptozę; **Bcl2** – białko regulujące uwalnianie cytochromu c; **Cys** – cysteina; **DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy; **ER** – retikulum endoplazmatyczne; **FAD** – dinukleotyd flawinoadeninowy; **GPx** – peroksydaza glutationowa; **Gly** – glicyna; **GR** – reduktaza glutationowa; **Grx** – glutaredoksyny; **GSH** – zredukowany glutation; **GSSG** – utleniony glutation; **His** – histydyna; **IFN-γ** – interferon γ; **IL-1β** – interleukina-1β; **JNK** – kinaza pośrednicząca w działaniu czynników stresowych; **MGd** – moteksafina gadolinu; **MKK3/4/6/7** – kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenem typu 3/4/6/7; **NADPH** – fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego; **NF-κB** – czynnik transkrypcyjny κB (nuclear factor κB); **p38** – kinaza białkowa aktywowana mitogenem; **p53** – czynnik transkrypcyjny o charakterze supresora nowotworowego; **PRL** – fosfataza regenerująca wątrobę; **Pro** – prolina; **Prx** – peroksyredoksyny; **PX-12** – disiarczek 1-metylopropylo-2-imidazolilowy; **Ref-1** – białko zdolne do regulowania stanu redoks; **RNR** – reduktaza rybonukleotydowa; **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **TAMs** – monocyty aktywowane przez Trx80 (Trx80 Activated Monocytes); **TBP-2** – białko 2 wiążące tioredoksynę; **TGR** – reduktaza tioredoksynowo-glutationowa; **TMX** – białka transbłonowe związane z tioredoksyną; **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu α (tumor necrosis factor α); **TPx** – peroksydaza tioredoksynowa; **TRADD** – apoptotyczny przekaźnik sygnału skojarzony z receptorem TNF; **TRAF2** – czynnik wiązany z receptorem TNF; **TRP** – białka związane z tioredoksyną (thioredoxin-related protein); **Trx** – tioredoksyna; **Trx80** – tzw. skrócona forma tioredoksyny; **TrxR** – reduktaza tioredoksyny; **SeCys** – selenocysteina; **Ser** – seryna; **SpTrx** – tioredoksyna typowa dla męskich narządów płciowych i plemników; **Val** – walina.

WPROWADZENIE

Równowaga redoks komórki, ze względu na stale generowane w komórce oksydanty, w wyniku metabolizmu komórkowego jak i działania czynników egzogennych, jest utrzymywana dzięki sprawnie funkcjonującemu systemowi antyoksydacyjnemu. W jego składzie istotny udział mają dwa układy, których działanie jest oparte o reakcje utleniania i redukcji typu ditiol-disulfid, jeden zależny od glutationu,

drugi od tioredoksyny. Zadaniem obydwu układów jest ochrona komórki przed skutkami wytwarzania oksydantów i powstawania stresu oksydacyjnego [23, 38, 68].

Składniki obu układów, niezależnie od działań antyoksydacyjnych, uczestniczą również w biosyntezie DNA oraz – przez dostarczanie elektronów dla reduktazy sulfotlenku metioniny – działają naprawczo jako donory RNR [5] i sulfotlenków metioniny w białkach [23, 38, 68].



Ryc. 1. Powiązanie systemów zależnych od glutationu oraz tioredoksyny. Trx i GSH mogą uczestniczyć w reakcjach redoks w sposób bezpośredni i pośredni. Działanie bezpośrednie polega na redukcji mostków disiarczkowych białek, w których udział bierze zredukowana tioredoksyna lub zredukowany glutation, które utlenione w wyniku reakcji ulegają redukcji w reakcji z reduktazą tioredoksyny (TrxR) lub reduktazą glutationu (GR). Działanie pośrednie polega na redukcji nadtlenków (zarówno organicznych, jak i nadtlenku wodoru) przez peroksydazę (peroksydazę tioredoksyny lub peroksydazę glutationową), która następnie jest regenerowana przez Trx lub GSH [wg 72 i 75 zmodyfikowano]

Układ zależny od glutationu (GSH) tworzy ten tripeptyd, reduktaza glutationowa (GR) i peroksydaza glutationowa (GPx), a fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) jest źródłem protonów. Układ, którego działanie oparte jest o możliwość występowania GSH w postaci zredukowanej i utlenionej, uczestniczy w utrzymywaniu właściwego stanu redoks komórek przez redukcję mostków disiarczkowych białek. GSH może bezpośrednio redukować mostki disiarczkowe w białkach lub uczestniczyć jako kosubstrat w redukcji nadtlenków organicznych oraz nadtlenku wodoru. Utleniona selenocysteina w centrum aktywnym GPx jest redukowana z udziałem GSH. Mechanizm działania tego układu wspiera redukcja utlenionego glutationu (GSSG) przez GR [72].

W skład układu zależnego od tioredoksyny (Trx) wchodzi to białko oraz reduktaza tioredoksyny (TrxR) i peroksydaza tioredoksyny (Prx), a źródłem protonów, podobnie jak w układzie glutationowym, jest NADPH (ryc. 1). Tioredoksyna może bezpośrednio redukować mostki disiarczkowe białek lub pośrednio, uczestnicząc w redukcji peroksydazy tioredoksyny, prowadzić do redukcji nadtlenków organicznych i nadtlenku wodoru. Działanie tego układu opiera się na redukcji mostka disiarczkowego w Trx przez TrxR. Zredukowana tioredoksyna uczestniczy w redukcji mostków disiarczkowych łączących dwie cząsteczki utlenionej peroksydazy tioredoksyny [11, 15, 59].

Analogicznie działające systemy występują jednocześnie w tych samych elementach komórki (tabela 1). Istotne jest jednak to, że efektywność ich działania różni się w zależności od miejsca występowania i dominacji działania jednego z układów, któremu towarzyszy wspierające funkcjonowanie drugiego. Stwierdzono, że redukcja białek w cytozolu zachodzi przede wszystkim z udziałem Trx [66, 83], natomiast w macierzy mitochondrialnej efektywność

tioredoksyny jest znacznie niższa i redukcja białek odbywa się głównie z udziałem glutationu. Ponadto w retikulum endoplazmatycznym redukcja białek odbywa się wyłącznie z udziałem GSH [44, 62].

SYSTEM TIOREDOKSYNOWY

Tioredoksyna

Tioredoksyna jest białkiem zawierającym w centrum aktywnym układ reszt cysteinowych, których grupy tiolowe mogą uczestniczyć w reakcjach redoks. Ze względu na miejsce występowania tego białka w komórce wyróżnia się izoformę cytozolową (Trx1) i izoformę mitochondrialną (Trx2), które występują w różnych tkankach organizmu człowieka (tabela 1). Gen kodujący Trx1 jest umiejscowiony na chromosomie 9 człowieka i składa się z pięciu egzonów, przedzielonych czterema intronami, natomiast Trx2 kodowana jest na chromosomie 22 [34, 52]. Istnieje również specyficzna rodzina tioredoksyn występujących w jądrach i plemnikach mężczyzny zawierająca izoformy SpTrx1, SpTrx2 i SpTrx3 [1].

Tioredoksyna występująca w cytozolu (Trx1) jest białkiem o masie 12 kDa [14]. W wyniku biosyntezy powstaje propeptyd zawierający 105 aminokwasów, z którego – w wyniku aktywacji – odłączona zostaje N-końcowa metionina i aktywna Trx1 zawiera 104 aminokwasy z waliną na N-końcu [1]. Natomiast mitochondrialna izoforma tioredoksyny (Trx2) jest biosyntetyzowana jako białko o masie 18 kDa zbudowane ze 166 aminokwasów, a na N-końcu zawiera sekwencję złożoną z 60 aminokwasów, która odpowiada za kierowanie nowo syntetyzowanej cząsteczki tioredoksyny do mitochondrium. Po osiągnięciu mitochondrium białko ulega hydrolizie z odszczepieniem 60-aminokwasowego peptydu, w wyniku czego otrzymuje się aktywne białko o masie 12,2 kDa [1, 65, 93].

Tabela 1. Porównanie systemów zależnych od tioredoksyny oraz glutationu [56, 72]

	System tioredoksynozależny	System glutationozależny
Elementy tworzące system	Trx, TrxR, TPx, NADPH	GSH, GR, GPx, NADPH
Istotne różnice	Trx – białko występujące w kilku izoformach	GSH – tripeptyd, występuje tylko w jednej postaci
Występowanie w organizmie (tkanki, narządy)	– osocze, – mięsień sercowy, – wątroba oraz pęcherzyk żółciowy, – płuca, – osteoblasty, – mózg, – naskórek i skóra właściwa, – jądra/jajniki, – neurony, – nadnercza, – nerki, – plemniki.	– osocze, – mięsień sercowy, – wątroba i pęcherzyk żółciowy, – płuca, – osteoblasty, – mózg, – naskórek i skóra właściwa, – jądra/jajniki, – neurony, – nadnercza, – nerki.
Występowanie w elementach komórki	– cytozol, – mitochondrium, – jądro komórkowe, – aparat Golgiego.	– cytozol, – mitochondrium [macierz i przestrzeń błonowa], – błony komórkowe, – retikulum endoplazmatyczne.

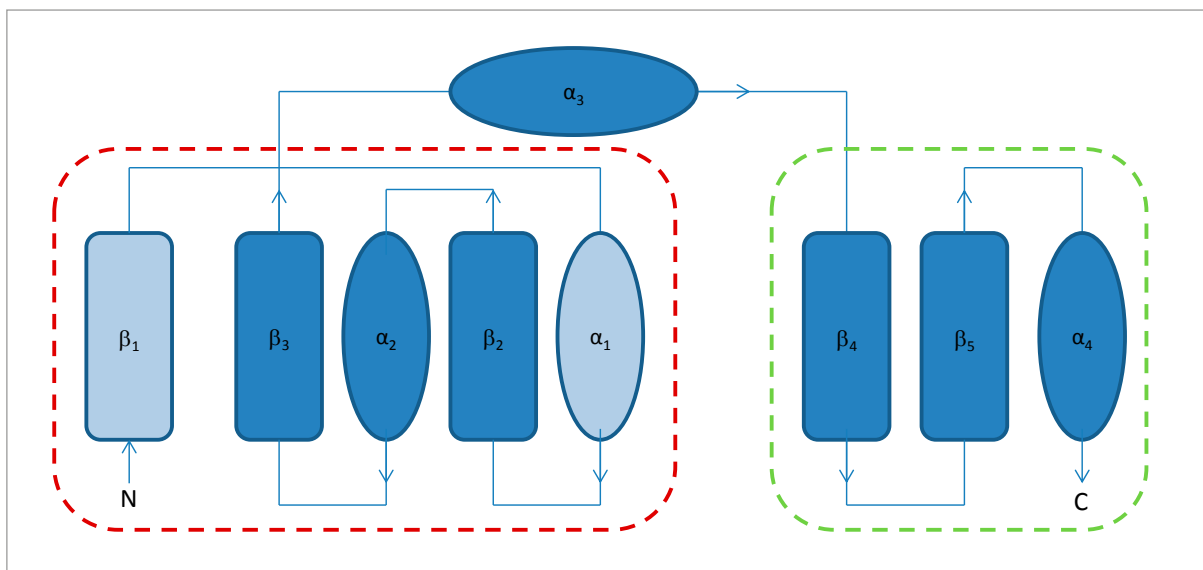
Wszystkie izoformy tioredoksyny zawierają w swojej części układ przestrzenny zwany „podstawowym motywem tioredoksyny” składający się z 3 α helis ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$) oraz 4 struktur β ($\beta 2$ – $\beta 5$). Trx1 oraz fragment cząsteczki Trx2 (z wyłączeniem fragmentu odpowiedzialnego za kierowanie białka do mitochondrium), oprócz podstawowego motywu tioredoksyny, zawierają dodatkową α helisę oraz strukturę β w domenie N-końcowej łańcucha polipeptydowego (ryc. 2; struktury oznaczone kolorem jaśniejszym), natomiast tzw. postać skrócona Trx1 (Trx80) pozbawiona jest struktury $\beta 5$ oraz helisy $\alpha 4$. W domenie N-końcowej tioredoksyny wyróżnia się trzy struktury β i dwie helisy α , połączone ze sobą w sposób naprzemienny. Domena C-końcowa białka składa się z dwóch połączonych ze sobą struktur β i jednej helisy α , która jest elementem skrajnym. Domeny N-końcowa i C-końcowa połączone są ze sobą za pomocą α helisy [47, 52, 89].

Istotnym elementem budowy Trx1 oraz Trx2 jest obecność centrum aktywnego (–Cys³²–Gly–Pro–Cys³⁵) umiejscowionego na końcu struktury $\beta 2$ oraz na początku długiej helisy $\alpha 2$, która odpowiada za antyoksydacyjne działanie tego białka. Reszty cysteiny z centrum aktywnego są ułożone w taki sposób, że bardziej eksponowana na działanie czynników zewnętrznych jest Cys³² (nazywana cysteiną N-końcową centrum aktywnego), natomiast Cys³⁵ (określana jako cysteina C-końcowa centrum aktywnego) jest ukryta [27]. Takie rozmieszczenie przestrzenne umożliwia działanie redukcyjne tioredoksyny, ponieważ w tworzeniu mostka disiarczkowego między tioredoksyną a redukowanym białkiem bezpośredni udział bierze N-końcowa cysteina, natomiast cysteina z pozycji 35 odpowiada za odłączenie cząsteczki zredukowanego białka oraz wytworzenie mostka disiльфidowego w obrębie tioredoksyny [77]. Zachowanie konserwatywnej sekwencji aminokwasów w centrum aktywnym jest niezbędne do prawidłowego

funkcjonowania białka, a modyfikacja składu centrum aktywnego (np. zastąpienie proliny przez serynę lub treoninę) powoduje zmianę konformacji białka, która obniża stabilność cząsteczki, co znacząco wpływa na możliwości redukujące tioredoksyny [18].

Ważnym elementem odróżniającym Trx1 od Trx2 jest obecność dodatkowych reszt cysteinowych w pozycjach 62, 69 i 73 w formie Trx1. Dzięki temu, w warunkach utleniających, gdy ilość Trx1 może być niedostateczna, do uczestniczenia w reakcjach redukcji mogą być włączane kolejne reszty cysteiny. Działanie takie w pierwszej kolejności prowadzi do wytworzenia drugiego mostka disiльфidowego między resztami cysteinowymi w pozycjach 62 i 69, a następnie utworzenia homodimeru z mostkiem disiльфidowym między resztami cysteiny w pozycji 73 dwóch cząsteczek Trx1. Wpływa to na zwiększenie zdolności antyoksydacyjnych tioredoksyny [87].

Niezależnie od klasycznej, pełnej izoformy Trx1 w organizmie obecna jest również skrócona tioredoksyna 1 (Trx80), gdyż część Trx1 biosyntetyzowanej w warunkach stresu oksydacyjnego ulega skróceniu na C-końcu, a to prowadzi do wytworzenia Trx80 [1, 50]. Izoforma ta o masie 10 kDa zbudowana jest z 80 lub 84 aminokwasów i nie może redukować mostków disiльфidowych innych białek, w przeciwieństwie do pełnej izoformy Trx1. Ilość Trx80 w organizmie nie jest powiązana z ekspresją Trx1 i wykazuje działanie podobne do cytokin prozapalnych oraz może stymulować wydzielanie substancji, takich jak np. czynnik martwicy nowotworu TNF- α czy interleukina-1 β . Wydzielanie cytokin odbywa się za pośrednictwem monocytów aktywowanych Trx80 (TAMs – Trx80 Activated Monocytes). TAMs hamują również namnażanie bakterii, wykazując działanie podobne do tego, jakie uzyskuje się przez działanie interferonem- γ . Może to sugerować, że monocyty



Ryc. 2. Struktura przestrzenna tioredoksyny; oznaczone ciemniejszym kolorem tworzą „podstawowy motyw tioredoksyny”. Czerwoną przerywaną linią zaznaczono domenę N-kończącą białka, natomiast kolorem zielonym zaznaczono domenę C-kończącą. N-kończąca domena tioredoksyny zawiera trzy struktury β i dwie helisy α , połączone ze sobą naprzemiennie. W C-kończącej domenie białka wyróżnia się dwie połączone ze sobą struktury β i jedną helisę α , która stanowi skrajny element tej struktury. Obie domeny łączy helisa α [wg 47 i 89 zmodyfikowano]

aktywowane przez Trx80 zwalczają infekcje bakteryjne zanim aktywowana zostanie odpowiedź odpornościowa limfocytów T [19]. Zaobserwowano natomiast, że skrócona postać tioredoksyny w komórkach gleju nie wykazuje działania prozapalnego, jakie obserwuje się w komórkach odpornościowych. Ponadto ilość Trx80 w mózgu ulega obniżeniu w niektórych chorobach neurodegeneracyjnych (np. w chorobie Alzheimera), a w tkance kory czołowej pacjentów z chorobą Alzheimera Trx80 występuje głównie w postaci agregatów o masie około 30 kDa [32].

Najmniej poznanymi izoformami tioredoksyny są występujące tylko w plemnikach oraz męskich narządach płciowych SpTrx1, SpTrx2 i SpTrx3 [41]. SpTrx1 zbudowana z 486 aminokwasów jest białkiem o masie 53 kDa, natomiast SpTrx2 i SpTrx3 mają masę odpowiednio 67 i 15 kDa i wszystkie trzy izoformy odpowiadają za dojrzewanie plemników w procesie spermatogenezy. Te izoformy tioredoksyny mają w swojej strukturze 4 dodatkowe cysteiny, dzięki czemu mogą tworzyć zarówno wewnątrzcząsteczkowe, jak i międzycząsteczkowe mostki disiarczkowe. W tych izoformach elementem niezbędnym do ich aktywności biologicznej jest domena N-kończąca, gdyż jej usunięcie z cząsteczki SpTrx prowadzi do znacznego spadku aktywności antyoksydacyjnej [41]. Najmniejsze z białek (SpTrx3) jest umiejscowione w aparacie Golgiego i przypuszcza się, że uczestniczy w hamowaniu aktywności biologicznej plemników, gdyż zwiększoną ekspresję izoformy tioredoksyny zaobserwowano w plemnikach nieplodnych mężczyzn [1, 41].

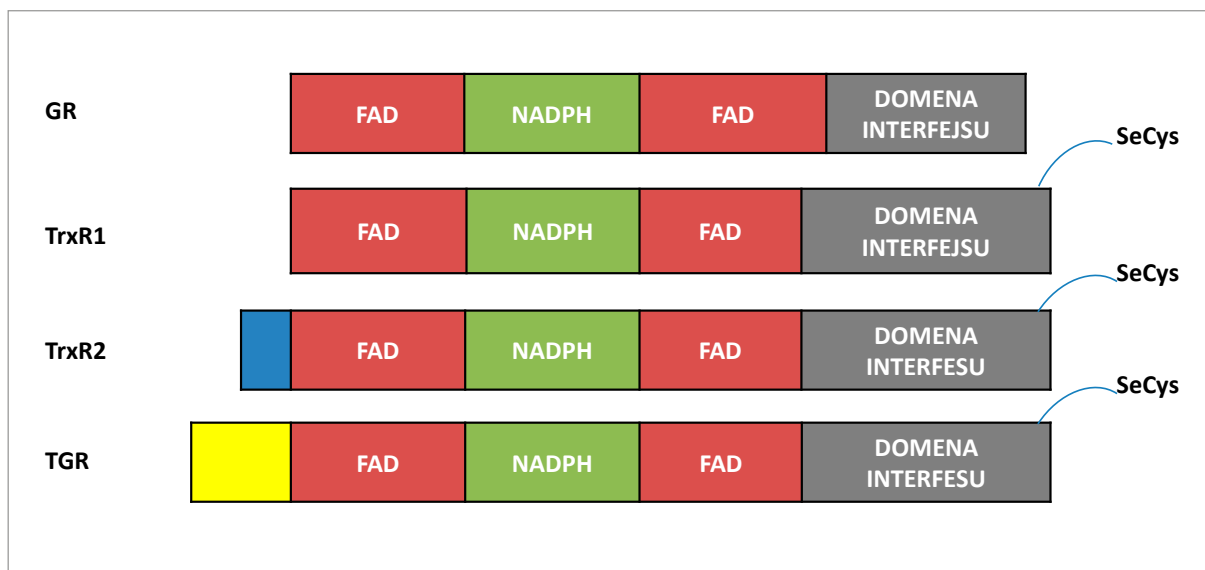
Tioredoxyna występuje zarówno w środowisku wewnątrzkomórkowym, jak i zewnątrzkomórkowym i w zależności od umiejscowienia może pełnić różne funkcje. Wewnątrz komórki najwięcej tioredoksyny jest w cytoplazmie, gdzie reguluje warunki utleniająco-redukujące [52].

Jednocześnie Trx reguluje aktywność czynników transkrypcyjnych w sposób bezpośredni (NF- κ B) lub pośredni (AP-1 przez oddziaływanie z czynnikiem jądrowym Ref-1) [2]. Pod wpływem stresu oksydacyjnego, zarówno Trx1, jak i NF- κ B migrują z cytoplazmy do jądra. Aby móc połączyć się z DNA i rozpocząć biosyntezę białek prozapalnych, czynnik transkrypcyjny musi mieć zredukowaną resztę cysteiny w pozycji 62. Obecna w jądrze Trx1 redukuje cysteinę cząsteczki NF- κ B, przez co odgrywa ważną rolę w regulacji biosyntezy białek [52]. Na zewnątrz komórki tioredoksyna wydzielana jest głównie w postaci Trx80 i pełni wtedy funkcję cytokiny chemotaktycznej [50, 56].

Reduktaza tioredoksyny

Enzymem odpowiedzialnym za redukcję utlenionej postaci tioredoksyny jest reduktaza tioredoksyny (TrxR) obecna w komórkach organizmów żywych. TrxR jest selenoenzymem zaliczanym do grupy flavoenzymów [78]. TrxR, przez redukcję tioredoksyny oddziałującej następnie z peroksydazą tioredoksyny, bierze udział (w sposób pośredni) w redukcji nadtlenków, w tym nadtlenku wodoru i nadtlenków lipidów.

Reduktaza tioredoksyny zawiera grupę prostetyczną FAD, domenę wiążącą NADPH, domenę interfejsu oraz centrum aktywne umiejscowione na C-końcu (ryc. 3). Struktura TrxR człowieka jest podobna do struktury GR, bowiem oba enzymy mają centrum aktywne na N-końcu zawierające motyw złożony z takich samych aminokwasów [12]. W centrum aktywnym TrxR, umiejscowionym na C-końcu jest obecna jedna cysteina oraz jedna selenocysteina (–Gly-Cys⁴⁹⁷–SeCys⁴⁹⁸–Gly–), a w obrębie domeny FAD znajduje się sekwencja –Cys⁵⁹–Val–Asn–Val–Gly–Cys⁶⁴–. Istotnym elementem aktywności reduktazy tioredoksyny jest reszta



Ryc. 3. Porównanie budowy reduktazy glutationowej (GR), cytozolowej reduktazy tioredoksyny (TrxR1), mitochondrialnej reduktazy tioredoksyny (TrxR2) oraz reduktazy tioredoksynowo-glutationowej (TGR). Na rycinie zaznaczono domeny wspólne (FAD-NADPH-FAD) oraz modyfikacje w domenie interfejsu (SeCys dla TrxR1, TrxR2 i TGR). Ponadto kolorem niebieskim w TrxR2 oznaczono charakterystyczną dla tego enzymu domenę zawierającą sekwencję mitochondrialną odpowiedzialną za przenoszenie biosyntetyzowanego białka do światła mitochondrium, natomiast kolorem żółtym w TGR oznaczono domenę odpowiedzialną za redukcję glutationu przez tą reduktazę [wg 54 oraz 58 zmodyfikowano]

selenocysteiny obecna w sekwencji na C-końcu enzymu. Ważnym jest również to, że nawet przy niewielkim niedoborze Se aktywność TrxR utrzymuje się na dostatecznym poziomie, podczas gdy inne selenoenzymy, w tym GPx, tracą aktywność biologiczną, co świadczy o znaczeniu TrxR w utrzymaniu homeostazy redoks [26, 47].

Istotnym dla aktywności biologicznej TrxR jest występowanie tego enzymu w postaci homodimeru. Częsteczki TrxR są ułożone w przestrzeni w taki sposób, że miejsca aktywne na N-końcu jednej częsteczki sąsiadują z cysteinami obecnymi na C-końcu drugiej molekuly, co jest ważne dla działania enzymu. Taka organizacja struktury przestrzennej enzymu pozwala na swobodny przepływ elektronów podczas reakcji redoks [19, 47].

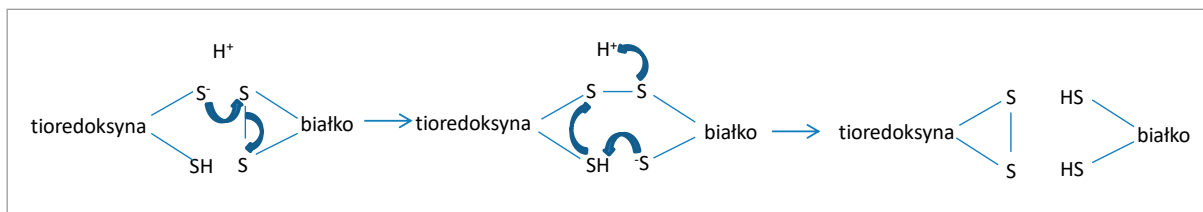
W organizmie człowieka TrxR występuje w trzech izoformach. TrxR1 jest izoformą reduktazy tioredoksyny obecną w cytozolu, zawierającą 499 aminokwasów o masie 55 kDa, natomiast TrxR2 jest jego mitochondrialnym odpowiednikiem zbudowanym z 524 aminokwasów. Różnicą między tymi izoformami jest obecność domeny mitochondrialnej w TrxR2 złożonej z 33 aminokwasów, umiejscowionej na N-końcu enzymu, która odpowiada za mitochondrialną translokację cząsteczek enzymu. Trzecią izoformą reduktazy tioredoksyny jest TrxR3 o masie 65 kDa złożona z 560 aminokwasów. Znajduje się w jądrze i wykazuje zdolność do redukcji zarówno tioredoksyny, jak i glutationu, dlatego jest określana jako reduktaza tioredoksynowo-glutationowa (TGR) [12, 73]. TGR wyróżnia się dodatkową domeną glutaredoksyny na N-końcu enzymu, dzięki czemu może działać jak reduktaza tioredoksyny, reduktaza glutationowa oraz glutaredoksyna, której celem jest redukcja mieszanych disulfidów białek powstających w procesie m.in. glutationylacji [23].

Glutaredoksyny (Grx) są białkami, które podobnie jak tioredoksyna, zawierają dwie cysteiny w centrum aktywnym w układzie -Cys-XXX-XXX-Cys-. Ich głównym zadaniem jest redukcja mieszanych disiarczków białek [31]. Zasadnicza różnica między Grx a Trx polega na tym, że do działania redukującego tioredoksyny niezbędna jest reduktaza tioredoksyny, natomiast glutaredoksyny jako źródło elektronów mogą wykorzystywać zredukowany glutation [31, 72]. Grx może działać w oparciu o mechanizm wymiany disulfid-ditiol lub katalizować redukcję substratów poprzez mechanizm monotioliowy [1, 85]. Istotne jest to, że Grx wykazuje takie działanie w warunkach redukujących, natomiast w warunkach utleniających pełni funkcję katalizatora reakcji glutationylacji białek. Znanie są postaci cytozolowe (Grx1 i Grx3) oraz mitochondrialne (Grx2 i Grx5) glutaredoksyn [9].

DZIAŁANIE UKŁADU TIOREDOKSYNA – REDUKTAZA TIOREDOKSYNY

Działanie antyoksydacyjne układu Trx-TrxR polega na tym, że tioredoksyna może ulegać odwracalnej reakcji redoks. Utleniona postać tego białka zawiera wewnątrzcząsteczkowy mostek disulfidowy, który redukowany jest do grup tioliowych za pośrednictwem TrxR [34].

Utleniona reduktaza tioredoksyny zawiera mostek disulfidowy w obrębie N-końca oraz selenosulfidowy w obrębie C-końca, które ulegają redukcji kosztem NADPH. Istotnym jest, iż powstaje wówczas wewnątrzcząsteczkowe wiązanie między domeną FAD enzymu a Cys⁵⁹ umiejscowioną na N-końcu. Cys⁶⁴ N-końca tworzy mostek disulfidowy z Cys⁴⁹⁷ C-końca drugiej podjednostki enzymu, który ulega degradacji w chwili przyłączenia utlenionej tioredoksyny, czemu towarzyszy ponowne utworzenie mostka disulfidowego w obrębie N-końca cząsteczki enzymu. Następnie



Ryc. 4. Schemat reakcji między zredukowaną cząsteczką tioredoksyny i białkiem zawierającym mostek disiarczkowy. Strzałki symbolizują przepływ elektronów podczas reakcji. Etap I: W wyniku interakcji Trx z atomem siarki mostka disiarczkowego utlenionego białka dochodzi do odszczepienia protonu od jednej z grup tiolowych w centrum aktywnym tioredoksyny. Atom siarki staje się donorem niesparowanego elektronu, umożliwiając zerwanie wewnątrzcząsteczkowego mostka disiarczkowego w cząsteczce utlenionego białka oraz utworzenie międzycząsteczkowego mostka disiarczkowego między utlenionym białkiem a tioredoksyną. Etap II: W wyniku zaistniałej sytuacji jest interakcja drugiego atomu siarki utlenionego białka, który ma niesparowany elektron z drugą grupą tiolową tioredoksyny i oderwanie od niej protonu. Osłabienie wiązania między tioredoksyną a zredukowanym białkiem powoduje, że atom siarki zredukowanego białka przyłącza wolny proton, tworząc drugą grupę tiolową w obrębie tego białka. Natomiast w obrębie tioredoksyny następuje przegrupowanie, powstaje mostek disiarczkowy [wg 52 zmodyfikowano]

tworzy się układ, w którym Cys³²Trx tworzy mostek selenosulfidowy z C-końcem enzymu. Zredukowana Trx ulega odszczepieniu, a w obrębie C-końca podjednostki enzymu tworzy się mostek selenosulfidowy. Wiązanie w obrębie N-końca jednej podjednostki enzymu ulega rozerwaniu w wyniku przeniesienia protonu z grupy tiolowej Cys⁵⁹ i wytworzenia wewnątrzcząsteczkowego mostka disulfidowego na C-końcu drugiej podjednostki, skutkującego również rozerwaniem wiązania między Cys⁶⁴ a domeną FAD. Taki częściowo utleniony dimer TrxR może pod wpływem oddziaływania z NADPH ulec redukcji i oddziaływać z kolejnymi cząsteczkami utlenionej Trx [47, 90].

Odtworzone w wyniku redukcji disulfidu grupy tiolowe tioredoksyny są zdolne do redukcji mostków disulfidowych białek [52]. W wyniku nukleofilowej redukcji następuje przeniesienie protonu z grup tiolowych tioredoksyny na cząsteczkę białka, co powoduje ponowne wytworzenie mostka disulfidowego w obrębie Trx i grup tiolowych w zredukowanej cząsteczce białka (ryc. 4). Utleniona tioredoksyna może ponownie zostać zredukowana przez reduktazę tioredoksyny z wykorzystaniem NADPH jako donora protonu, dzięki czemu Trx może ponownie pełnić funkcję antyoksydacyjną. Istotnym jest to, że utleniona postać Trx jest bardziej stabilna niż zredukowana, więc redukcja białek z jednoczesnym utlenieniem tioredoksyny jest korzystna termodynamicznie [18].

Zaobserwowano, że w przypadku zaburzenia funkcjonowania układu glutation–reduktaza glutationowa ze względu na ograniczoną ilość GR, TrxR może przejąć funkcję reduktazy glutationowej, zapobiegając tym samym nadmiernej kumulacji GSSG [82].

Inną, równie istotną funkcją układu zależnego od tioredoksyny jest udział w regulacji ekspresji wielu genów za pośrednictwem czynnika transkrypcyjnego NF-κB, jak również kinazy regulującej apoptozę (ASK-1) oraz białka 2 wiążącego tioredoksynę (TBP-2). Zaobserwowano, że działanie czynnika martwicy nowotworów (TNF-α) powoduje wzrost biosyntezy reduktazy tioredoksyny, co pośrednio skutkuje wzrostem aktywności czynnika NF-κB (bezpośredni wpływ na aktywność NF-κB ma tioredoksyna), przez co następuje zwiększenie ekspresji regulowanych przez niego genów.

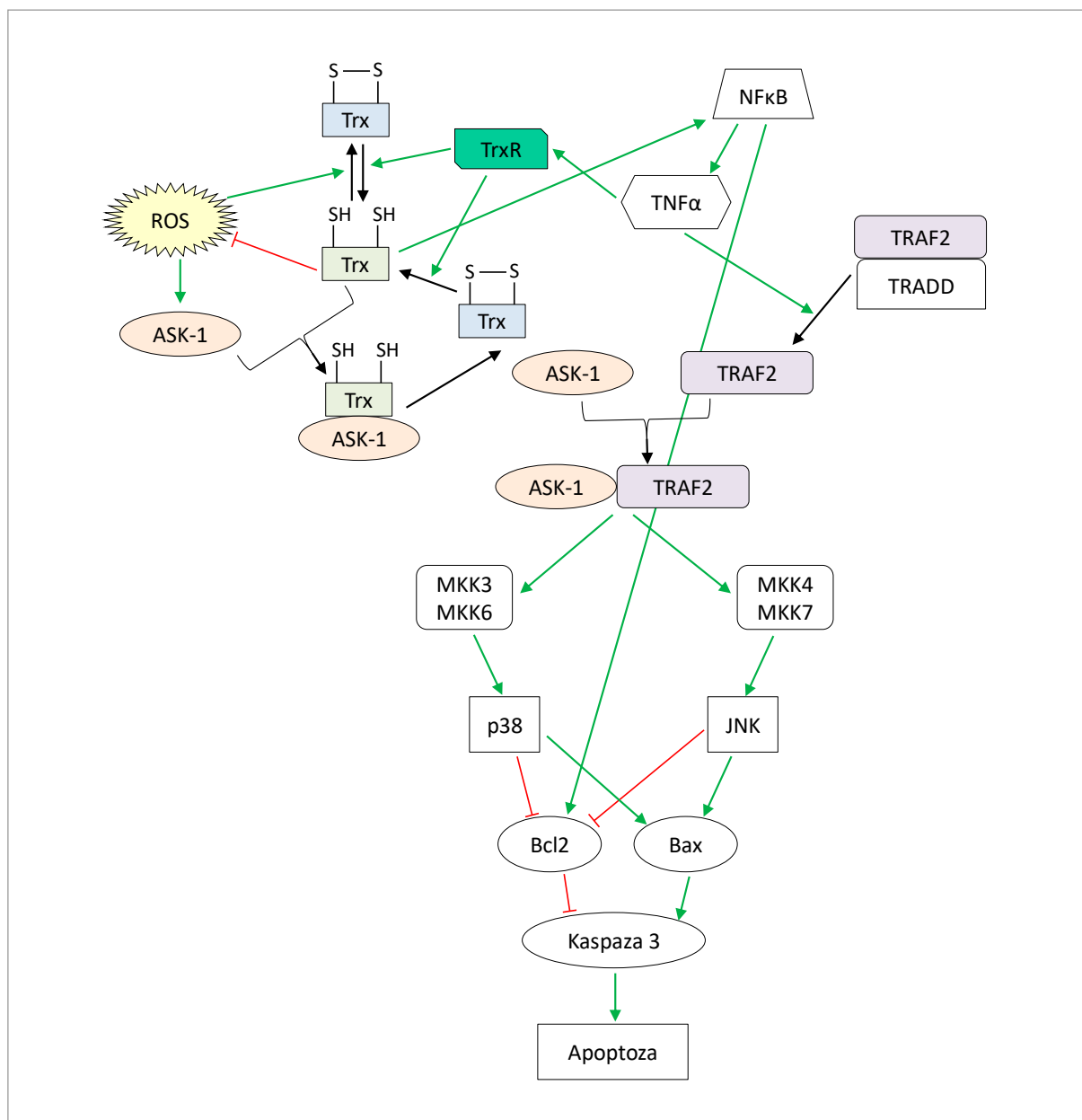
Natomiast zredukowana tioredoksyna może wchodzić w interakcję z ASK-1, a to powoduje zahamowanie funkcji tego enzymu (ryc. 5). Wskazuje to, że komórki nowotworowe zwiększają ekspresję tioredoksyny, aby uniknąć śmierci w procesie apoptozy, a działanie takie potwierdza dodatkowo zwiększona zawartość Trx i TrxR w komórkach nowotworów cechujących się dużą agresywnością oraz dużym potencjałem tworzenia przerzutów [14, 45].

Ponadto układ tioredoksyna–reduktaza tioredoksyny wpływa na zdolność łączenia białka p53 kwasem deoksyrybonukleinowym. Udowodniono, że hamowanie działania układu Trx–TrxR przez kwas rybonukleinowy zwiększa aktywność białka p53 i znacznie zwiększa wydajność jego wiązania z DNA. Zmniejsza to prawdopodobieństwo transformacji nowotworowej [55].

Głównym celem działania układu tworzonego przez Trx i TrxR jest ochrona komórek przed negatywnymi skutkami stresu oksydacyjnego. Działanie takie zabezpiecza komórki przed apoptozą, która może zostać wywołana przez reaktywne formy tlenu (ROS), generowane endogennie w czasie procesów patologicznych [16, 84], jak i czynników egzogennych, np. promieniowania UV [46], które jest niezbędne do przekształcenia 7-dehydrocholesterolu podczas fotoizomeryzacji w prowitaminę D3 [48], ale jednocześnie nasila generowanie ROS [22, 63].

Peroksydaza tioredoksyny

Pełna skuteczność działania układu zależnego od tioredoksyny zależy od aktywności peroksydazy tioredoksyny (TPx), która z tioredoksyną może redukować nadtlenki lipidów oraz nadtlenek wodoru. TPx należy do rodziny białek nazywanych peroksyredoksynami (Prx), które w swoim centrum aktywnym zawierają cysteinę (Prx-SH) podatną na utlenianie. Cząsteczka peroksyredoksyny w wyniku redukcji nadtlenków przechodzi w postać utlenioną Prx-SOH, która w reakcji z inną zredukowaną cząsteczką peroksyredoksyny tworzy disiarczek (Prx-S-S-Prx) z jednoczesnym wydzielaniem wody. TPx zawiera Cys⁴⁷ i Cys¹⁷⁰, które uczestniczą w redukcji nadtlenków. Tak odległe ułożenie cystein sprawia, że nie jest możliwe wytworzenie wewnątrzcząsteczkowego mostka disulfidowego.

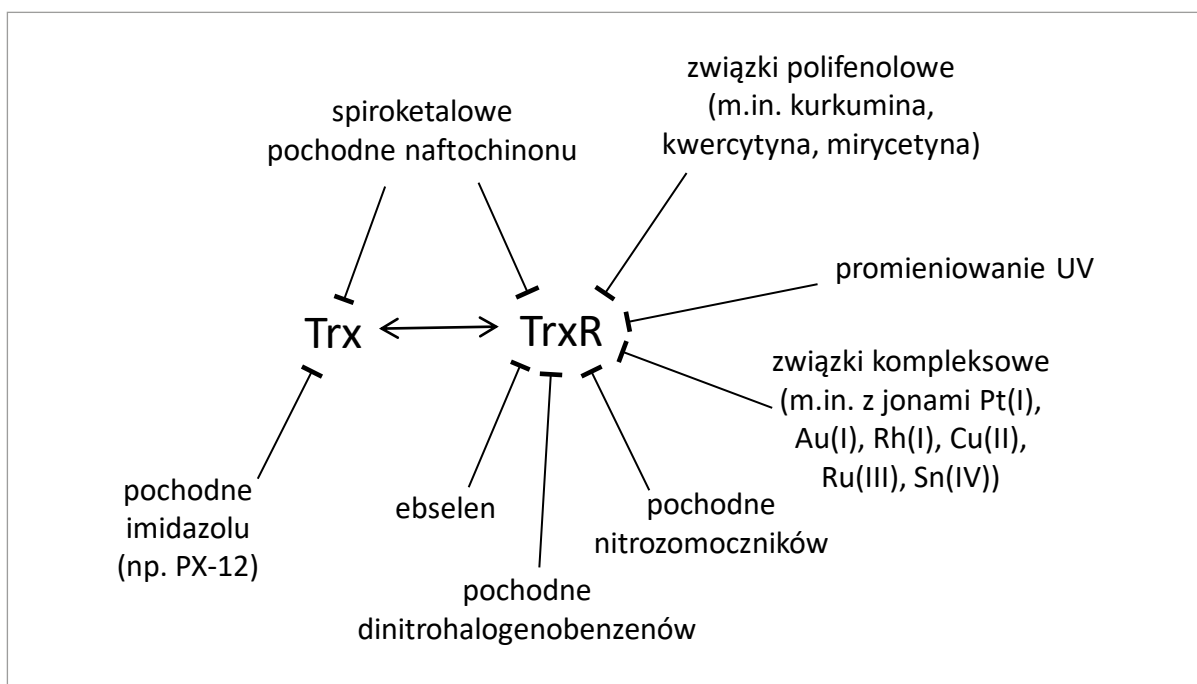


Ryc. 5. Wpływ czynnika martwicy nowotworu oraz czynnika transkrypcyjnego κB na oddziaływanie między tioredoksyną a kinazą regulującą apoptozę (ASK-1). Zredukowana cząsteczka tioredoksyny aktywuje czynnik transkrypcyjny NF- κB , który nasilając biosyntezę TNF- α , przyczynia się do aktywacji TrxR. Trx jest również aktywatorem ASK-1, która w wyniku wielu przemian obejmujących m.in. aktywację białka proapoptotycznego Bax oraz zahamowanie aktywności białka antyapoptotycznego Bcl2 prowadzi do aktywacji wykonawczej kaspazy-3, rozpoczynając proces śmierci komórki w procesie apoptozy [wg 54, 58 i 72 zmodyfikowano]

W związku z tym utleniona TPx występuje w postaci dimerów, w których występują dwa międzycząsteczkowe mostki w układzie Cys⁴⁷-Cys¹⁷⁰ [75]. Działanie tego enzymu wymaga obecności zredukowanej tioredoksyny. Zredukowana Trx redukuje reszty cysteinowe TPx, które następnie redukują cząsteczki nadtlenu obecnych w pobliżu enzymu [74, 75]. TPx skutecznie usuwa nadtlenu z komórek, chroniąc w ten sposób inne cząsteczki przed uszkodzeniami, jakie mogą być wywoływane przez ROS [51]. Skuteczność tego enzymu jest porównywalna do peroksydazy glutationowej w usuwaniu nadtlenu wodoru [30].

Białka związane z tioredoksyną (TRP)

Do tzw. nadrodziny tioredoksyny zaliczane są również białka, które zawierają charakterystyczną dla tioredoksyny sekwencję centrum katalitycznego z dwiema cysteinami. Białka te oznaczane są jako TRPxx, xx wskazuje na jego masę cząsteczkową. Do tej grupy zalicza się TRP14, białko o masie 14 kDa wyizolowane, z mózgu szczura, które zbudowane jest ze 123 aminokwasów, a w centrum aktywnym zlokalizowanym na początku helisy $\alpha 2$ (podobnie jak w Trx) zawiera sekwencję -Trp-Cys⁴³-Pro-Asp-Cys⁴⁶-.



Ryc. 6. Zestawienie inhibitorów układu zależnego od tioredoksyny (Trx-TrxR) z uwzględnieniem kierunku działania czynnika fizycznego (promieniowanie UV) i czynników chemicznych. Czynniki chemiczne obejmują związki dezaktywujące tioredoksynę (pochodne imidazolu i naftochinonu) oraz związki hamujące aktywność reduktazy tioredoksyny (związki polifenolowe, pochodne imidazolu i dinitrohalogenobenzenów, ebselen i związki kompleksowe)

TRP14 ma w cząsteczce łącznie pięć reszt cysteiny, ale jedynie te obecne w centrum aktywnym, ze względu na przestrzenne ułożenie w białku, są eksponowane i podatne na działanie czynników utleniających. TRP14 nie wykazuje działania redukującego w porównaniu do niektórych typowych dla tioredoksyny substratów (np. Prx, RNR), ale uczestniczy w redukcji nitrozotioili oraz cystyny. Ponadto utleniona TRP14 jest substratem TrxR1 [10, 24, 88].

Innym białkiem powiązanym z Trx jest TRP32 zbudowane z 289 aminokwasów o charakterystycznej masie 32 kDa. TRP32 występuje w cytoplazmie komórek człowieka. W jego strukturze można wyróżnić fragment N-końcowy (100-aminokwasowy), który ma znacznie większe podobieństwo w porównaniu do sekwencji ludzkiej tioredoksyny. TRP32 zawiera również domenę C-kończącą o nieznannej funkcji złożoną ze 190 aminokwasów (określaną jako DUF1000 lub PITH) [33].

Analiza DUF1000 wykazuje identyczność (na poziomie 99%) między sekwencją ludzkiego TRP32 a białkiem wyizolowanym od myszy. Zaobserwowano, że skuteczność redukcji mostków disulfidowych za pośrednictwem TRP32 jest znacznie niższa niż analogiczna reakcja z udziałem Trx1. Uważa się, że wynika to z tego, że glicyna występująca bezpośrednio przed centrum aktywnym w Trx1 zastępuje ją w TRP32 przez tryptofan. Stwierdzono, że TRP32 powoduje redukcję utlenionej fosfatazy regenerującej wątroby (PRL), która odpowiada za tworzenie przerzutów w procesie nowotworowym. Sugeruje się, że białko TRP32 może być głównym elementem uczestniczącym w procesie przerzutowania [40].

Białka transbłonowe związane z tioredoksyną (TMX)

W retikulum endoplazmatycznym (ER) komórek człowieka występują cztery białka transbłonowe (określane jako TMX1, TMX2, TMX3 i TMX4), które w centrum aktywnym zawierają sekwencję podobną do tioredoksyny (-Cys-XXX-XXX-Cys-) [25, 61, 80]. Białka TMX1, TMX3 i TMX4 zawierają domeny transbłonowe, odpowiednio -Cys-Pro-Ala-Cys-, -Cys-Gly-His-Cys- i -Cys-Pro-Ser-Cys- oraz sekwencję sygnałową odpowiadającą za kierowanie biosyntetyzowanego białka do ER [28]. TMX4 jest białkiem transbłonowym, którego domena analogiczna do tioredoksyny skierowana jest w stronę światła ER. W badaniach *in vitro* potwierdzono, że domena ta jest zdolna do redukcji innych białek, co wskazuje, że TMX4 może pełnić funkcję reduktora w środowisku retikulum endoplazmatycznego [80]. TMX2, podobnie jak TMX1, TMX3 i TMX4 zawiera dwie ostatnie domeny, ale w sekwencji obecnej w centrum katalitycznym w miejscu jednej z cystein obecna jest seryna (-Ser-Asn-Asp-Cys-), w wyniku czego białko to nie działa redukująco, jak wszystkie białka z rodziny tioredoksyny [36, 61, 86].

INHIBITORY UKŁADU TIOREDOKSYNY

Ze względu na to, w wielu stanach patologicznych, w tym znacznej części nowotworów, obserwuje się wzrost ekspresji tioredoksyny oraz reduktazy tioredoksyny, uważa się, że związki powodujące trwałe wiązanie jednego z elementów systemu Trx-TrxR może się okazać skuteczne w terapii przeciwnowotworowej [59]. Dlatego też część

preparatów stosowanych w farmakoterapii nowotworów hamuje działanie tioredoksyny lub reduktazy tioredoksyny [38]. W związku z tym od wielu lat prowadzi się badania nad znalezieniem skutecznych, a jednocześnie selektywnych sposobów modyfikacji aktywności układu Trx-TrxR. Tak więc do inaktywacji tego układu proponowanych jest wiele naturalnych czynników chemicznych/fizycznych oraz wiele związków syntetycznych, głównie na bazie kompleksów jonów metali przejściowych (ryc. 6).

Jedynym czynnikiem fizycznym, którego działanie powoduje inaktywację TrxR jest promieniowanie ultrafioletowe. Wykazano, że promieniowanie UVA i UVB nawet w dawce poniżej minimalnej dawki rumieniowej powoduje znaczną inaktywację reduktazy tioredoksyny, co znacznie ogranicza działanie antyoksydacyjne układu Trx-TrxR [39, 42].

Spośród naturalnych czynników chemicznych niektóre naturalne związki polifenolowe [3] wykazują tendencję do hamowania aktywności enzymatycznej reduktazy tioredoksyny. Stwierdzono, że w wyniku działania kurkuminy na C-końcowy fragment enzymu TrxR ulega nieodwracalnej inhibicji i w wyniku zmodyfikowania nie jest zdolna do redukcji białek, co powoduje wzrost stężenia ROS [13]. Analogiczne działanie obserwowano po zastosowaniu kwercetyny oraz mirycetyny, które podobnie jak kurkumina, powodują nieodwracalne zahamowanie aktywności reduktazy tioredoksyny, a to sprzyja powstawaniu stresu oksydacyjnego [53, 76].

Wśród związków syntetycznych modyfikujących funkcjonowanie układu zależnego od tioredoksyny przez hamowanie aktywności biologicznej Trx lub TrxR należy wskazać związki z grupy disiarczkowych pochodnych imidazolu i naftochinonu, jak również wiele organicznych i nieorganicznych związków kompleksowych zawierających jony metali przejściowych jako atomu centralnego.

Do związków modulujących funkcjonowanie układu Trx-TrxR należą disiarczki alkilo-2-imidazolilowe, w tym disiarczki 1-metylopropylo-2-imidazolilowy, który jako inhibitor Trx1 został dopuszczony do badań klinicznych w postaci preparatu PX-12 [6, 7, 43]. Związek był testowany u chorych z zaawansowanymi nowotworami opornymi na leki [69, 70]. Działanie tej grupy związków chemicznych opiera się na reakcji tioalkilowania Cys³² i Cys³⁵ centrum katalitycznego oraz Cys⁷³ spoza centrum katalitycznego Trx. Reakcje w obrębie Cys³² i Cys³⁵ zachodzą w sposób odwracalny i szybki, natomiast reakcja z udziałem Cys⁷³ jest nieodwracalna i znacznie wolniejsza [49].

Do związków hamujących działanie układu Trx-TrxR należą również spiroketalowe związki naftochinonu, do których zalicza się m.in. pleurotynę [8, 79, 81]. Związki tej grupy działają głównie jako inhibitory Trx, w niektórych przypadkach jako inhibitory w stosunku do TrxR [57, 67].

Dużą grupę czynników modyfikujących aktywność TrxR tworzą kompleksy jonów metali, głównie przejściowych. Spośród związków chemicznych hamujących aktywność

TrxR, jednymi z najsilniej działających są kompleksy platyny i złota stosowane w wielu nowotworach, w tym cisplatyna i karboplatyna [20, 64], które hamują nieodwracalnie aktywność TrxR przy zachowaniu aktywności innych reduktaz (np. glutaredoksyny czy reduktazy glutationowej) [29, 37]. Chlorek lantanu (III) (LaCl₃) również wykazuje działanie hamujące aktywność reduktazy tioredoksyny [17]. Innymi związkami hamującymi aktywność reduktazy tioredoksyny są organiczne kompleksy zawierające jony cyny lub rutenu na odpowiednio +4 i +3 stopniu utlenienia [21, 58]. Hamująco działa w stosunku do reduktazy tioredoksyny ma również moksafina gadolinu (MGd), która jest lekiem stosowanym w terapii przeciwnowotworowej. W przypadku tego związku obserwuje się bezpośrednie wiązanie MGd z TrxR, przy czym lek ten nie wiąże się z centrum aktywnym enzymu [35]. Oprócz wymienionych związków metaloorganicznych, działanie hamujące aktywność wykazują kompleksy zawierające rod oraz miedź. Stwierdzono, że związki kompleksowe zawierające jon Rh(I) również hamowały aktywność TrxR i wykazywały działanie antyproliferacyjne w stosunku do komórek nowotworowych (m.in. gruczolaka piersi oraz raka jelita grubego), które mogło wynikać z oddziaływania badanych związków na TrxR [54, 60, 92].

Do grupy inhibitorów reduktazy tioredoksyny zalicza się również ebselen – związek organiczny zdolny do redukcji nadtlenków lipidów czy H₂O₂ z jednoczesnym wytworzeniem kwasu selenolowego (EbSeOH). W komórkach ssaków związek ten jest substratem TrxR, która redukuje postać EbSeOH do aktywnej selenolowej (EbSeH) [71].

Organiczne związki z grupy nitrozomoczników, dinitrohalogenobenzenów oraz syntetyczne związki polifenolowe o charakterze elektrofilowym są również zdolne do interakcji i modyfikacji grup tiolowej oraz selenowej TrxR [34]. Związki te mogą się także wiązać z innymi grupami funkcyjnymi skutecznie hamując aktywność TrxR [57]. Tak zmodyfikowana reduktaza tioredoksyny odpowiada za rozpoczęcie procesu przemian prowadzących ostatecznie do apoptozy komórek [3, 4].

W związku z powyższym można sugerować, że przyszłością prac nad inhibitorami układu zależnego od tioredoksyny będzie modyfikacja struktur chemicznych poszczególnych inhibitorów, która zwiększałaby selektywność ich oddziaływania z Trx czy TrxR. Jednocześnie uważa się, że obiecujące mogłoby się okazać wprowadzenie w strukturę cząsteczki inhibitorów takich elementów, które odpowiadałyby za skierowanie ich do wnętrza mitochondriów [91], a jednocześnie zwiększałyby ich stabilność oraz spowodowałyby ograniczenie działań niepożądanych związanych z wprowadzaniem ich do organizmu człowieka.

PODSUMOWANIE

Jednym z elementów funkcjonalnych komórek odpowiedzialnych za utrzymanie równowagi redoks jest układ zależny od tioredoksyny, który uczestniczy również w regulowaniu aktywności biologicznej wielu białek, co powoduje,

w zależności od sytuacji, uruchamianie dróg sygnałowych prowadzących do apoptozy lub proliferacji komórek. Stwierdzono, że w procesie transformacji nowotworowej komórek dochodzi do nadekspresji zarówno tioredoksyny, jak i reduktazy tioredoksyny, a to sprzyja nasilonej proliferacji. W związku z tym, w celu zablokowania układu zależnego od tioredoksyny, poszukuje się czynników zarówno

naturalnych (promieniowanie UV lub polifenole roślinne), jak i związków syntetycznych, głównie na bazie kompleksów jonów metali, które hamowałyby działanie tioredoksyny lub reduktazy tioredoksyny, limitując w ten sposób ochronne działanie składników układu zależnego od tioredoksyny i prowadziłoby do apoptozy komórek nowotworowych.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ahsan M.K., Lekli I., Ray D., Yodoi J., Das D.K.: Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: An implication of redox gene therapy in the heart. *Antioxid. Redox Signal.*, 2009; 11: 2741–2758
- [2] An N., Kang Y.: Thioredoxin and hematologic malignancies. W: *Advances in Cancer Research*, t. 122, red.: D.M. Townsend, K.D. Tew. Academic Press, London, 2014, 245–279
- [3] Arnér E.S.: Focus on mammalian thioredoxin reductases – important selenoproteins with versatile functions. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1790: 495–526
- [4] Arnér E.S.: Selenocysteine insertion and reactivity: Mammalian thioredoxin reductases in relation to cellular redox signaling. W: *Cellular Implications of Redox Signaling*, red.: C. Gitler, A. Danon. Imperial College Press, London 2003, 27–45
- [5] Avval F.Z., Holmgren A.: Molecular mechanisms of thioredoxin and glutaredoxin as hydrogen donors for Mammalian S phase ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 8233–8240
- [6] Baker A.F., Adab K.N., Raghunand N., Chow H., Stratton S.P., Squire S.W., Boice M., Pestano L.A., Kirkpatrick D.L., Dragovich T.: A phase IB trial of 24-hour intravenous PX-12, a thioredoxin-1 inhibitor, in patients with advanced gastrointestinal cancers. *Invest. New Drugs*, 2013; 31: 631–641
- [7] Baker A.F., Dragovich T., Tate W.R., Ramanathan R.K., Roe D., Hsu C.H., Kirkpatrick D.L., Powis G.: The antitumor thioredoxin-1 inhibitor PX-12 (1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide) decreases thioredoxin-1 and VEGF levels in cancer patient plasma. *J. Lab. Clin. Med.*, 2006; 147: 83–90
- [8] Berdicevsky I., Kaufman G., Newman D.J., Horwitz B.A.: Preliminary study of activity of the thioredoxin inhibitor pleurotin against Trichophyton mentagrophytes: A novel anti-dermatophyte possibility. *Mycoses*, 2009; 52: 313–317
- [9] Berndt C., Lillig C.H., Holmgren A.: Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1783: 641–650
- [10] Bignon E., Allega M.F., Lucchetta M., Tiberti M., Papaleo E.: Computational structural biology of S-nitrosylation of cancer targets. *Front. Oncol.*, 2018; 8: 272
- [11] Bilska A., Kryczyk A., Włodek L.: Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 438–453
- [12] Brandstaedter C., Fritz-Wolf K., Weder S., Fischer M., Hecker B., Rahlfs S., Becker K.: Kinetic characterization of wild-type and mutant human thioredoxin glutathione reductase defines its reaction and regulatory mechanisms. *FEBS J.*, 2018; 285: 542–558
- [13] Cai W., Zhang B., Duan D., Wu J., Fang J.: Curcumin targeting the thioredoxin system elevates oxidative stress in HeLa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2012; 262: 341–348
- [14] Chen X., Tang W., Liu S., Yu L., Chen Z.: Thioredoxin-1 phosphorylated at T100 is needed for its anti-apoptotic activity in HepG2 cancer cells. *Life Sci.*, 2010; 87: 254–260
- [15] Chondrogianni N., Petropoulos I., Grimm S., Georgila K., Cat-algol B., Friguet B., Grune T., Gonos, E.S.: Protein damage, repair and proteolysis. *Mol. Aspects Med.*, 2014; 35: 1–71
- [16] Circu M.L., Aw T.Y.: Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010; 48: 749–762
- [17] Citta A., Folda A., Scutari G., Cesaro L., Bindoli A., Rigobello, M.P.: Inhibition of thioredoxin reductase by lanthanum chloride. *J. Inorg. Biochem.*, 2012; 117: 18–24
- [18] Collet J.F., Messens J.: Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid. Redox Signal.*, 2010; 13: 1205–1216
- [19] Cortes-Bratti X., Bassères E., Herrera-Rodriguez F., Botero-Kleiven S., Coppotelli G., Andersen J.B., Masucci M.G., Holmgren A., Chaves-Olarte E., Frisan T., Avila-Carino J.: Thioredoxin 80-activated-monocytes (TAMs) inhibit the replication of intracellular pathogens. *PLoS One*, 2011; 6: e16960
- [20] Cutillas N., Yellol G.S., de Haro C., Vicente C., Rodríguez V., Ruiz J.: Anticancer cyclometalated complexes of platinum group metals and gold. *Coord. Chem. Rev.*, 2013; 257: 2784–2791
- [21] de Oliveira K.N., Andermark V., Onambele L.A., Dahl G., Prokop A., Ott, I.: Organotin complexes containing carboxylate ligands with maleimide and naphthalimide derived partial structures: TrxR inhibition, cytotoxicity and activity in resistant cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.*, 2014; 87: 794–800
- [22] Dmitrenko O., Orlova T., Terenetskaya I.: Medium controlled photochemistry of provitamin D: From solutions to liquid crystals. *J. Mol. Liq.*, 2018; 267: 428–435
- [23] Dobrovol'ska O., Rychkov G., Shumilina E., Nerinovski K., Schmidt A., Shabalin K., Yakimov A., Dikiy A.: Structural insights into interaction between mammalian methionine sulfoxide reductase B1 and thioredoxin. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012; 2012: 586539
- [24] Dóka É., Pader I., Bíró A., Johansson K., Cheng Q., Ballagó K., Prigge J.R., Pastor-Flores D., Dick T.P., Schmidt E.E., Arnér E.S., Nagy P.: A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems. *Sci. Adv.*, 2016; 2: e1500968
- [25] Ellgaard L., Ruddock L.W.: The human protein disulphide isomerase family: Substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.*, 2005; 6: 28–32
- [26] Fang J., Holmgren A.: Inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase by 4-hydroxy-2-nonenal in vitro and in vivo. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006; 128: 1879–1885
- [27] Fujiwara N., Fujii T., Fujii J., Taniguchi N.: Roles of N-terminal active cysteines and C-terminal cysteine-selenocysteine in the catalytic mechanism of mammalian thioredoxin reductase. *J. Biochem.*, 2001; 129: 803–812
- [28] Galligan J.J., Petersen D.R.: The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum. Genomics*, 2012; 6: 6
- [29] Gandin V., Fernandes A.P.: Metal- and semimetal-containing inhibitors of thioredoxin reductase as anticancer agents. *Molecules*, 2015; 20: 12732–12756

- [30] Gaschler M.M., Stockwell B.R.: Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017; 482: 419–425
- [31] Ghezzi P.: Protein glutathionylation in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013; 1830: 3165–3172
- [32] Gil-Bea F., Akterin S., Persson T., Mateos L., Sandebring A., Avila-Cariño J., Gutierrez-Rodriguez A., Sundström E., Holmgren A., Winblad B., Cedazo-Minguez A.: Thioredoxin-80 is a product of alpha-secretase cleavage that inhibits amyloid-beta aggregation and is decreased in Alzheimer's disease brain. *EMBO Mol. Med.*, 2012; 4: 1097–1111
- [33] Goroncy A.K., Koshiba S., Tochio N., Tomizawa T., Inoue M., Tanaka A., Sugano S., Kigawa T., Yokoyama S.: Solution structure of the C-terminal DUF1000 domain of the human thioredoxin-like 1 protein. *Proteins*, 2010; 78: 2176–2180
- [34] Gromer S., Urig S., Becker K.: The thioredoxin system – from science to clinic. *Med. Res. Rev.*, 2004; 24: 40–89
- [35] Hashemy S.I., Ungerstedt J.S., Avval F.Z., Holmgren A.: Motexafin gadolinium, a tumor-selective drug targeting thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 10691–10697
- [36] Hatahet F., Ruddock L.W.: Protein disulfide isomerase: A critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid. Redox Signal.*, 2009; 11: 2807–2850
- [37] Hickey J.L., Ruhayel R.A., Barnard P.J., Baker M.V., Berners-Price S.J., Filipovska A.: Mitochondria-targeted chemotherapeutics: The rational design of gold (I) N-heterocyclic carbene complexes that are selectively toxic to cancer cells and target protein selenols in preference to thiols. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008; 130: 12570–12571
- [38] Holmgren A., Lu J.: Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; 396: 120–124
- [39] Hruza L.L., Pentland A.P.: Mechanisms of UV-induced inflammation. *J. Invest. Dermatol.*, 1993; 100: S35–S41
- [40] Ishii T., Funato Y., Miki H.: Thioredoxin-related protein 32 (TRP32) specifically reduces oxidized phosphatase of regenerating liver (PRL). *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 7263–7270
- [41] Jiménez A., Zu W., Rawe V.Y., Pelto-Huikko M., Flickinger C.J., Sutovsky P., Gustafsson J.Å., Oko R., Miranda-Vizuet A.: Spermatocyte/spermatid-specific thioredoxin-3, a novel Golgi apparatus-associated thioredoxin, is a specific marker of aberrant spermatogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 34971–34982
- [42] Jones D.A.: Rosacea, reactive oxygen species, and azelaic acid. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.*, 2009; 2: 26–30
- [43] Ju Y., Wu L., Yang G.: Thioredoxin 1 regulation of protein S-desulphydration. *Biochem. Biophys. Rep.*, 2016; 5: 27–34
- [44] Kakkar P., Singh B.K.: Mitochondria: A hub of redox activities and cellular distress control. *Mol. Cell. Biochem.*, 2007; 305: 235–253
- [45] Karlenius T.C., Tonissen K.F.: Thioredoxin and cancer: A role for thioredoxin in all states of tumor oxygenation. *Cancers*, 2010; 2: 209–232
- [46] Korkina L.: Metabolic and redox barriers in the skin exposed to drugs and xenobiotics. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2016; 12: 377–388
- [47] Lee S., Kim S.M., Lee R.T.: Thioredoxin and thioredoxin target proteins: From molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid. Redox Signal.*, 2013; 18: 1165–1207
- [48] Lehmann B., Meurer M.: Vitamin D metabolism. *Dermatol. Ther.*, 2010; 23: 2–12
- [49] Li G.Z., Liang H.F., Liao B., Zhang L., Ni Y.A., Zhou H.H., Zhang E.L., Zhang B.X., Chen X.P.: PX-12 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma by inducing S-phase arrest, ROS-dependent apoptosis and enhances 5-FU cytotoxicity. *Am. J. Transl. Res.*, 2015; 7: 1528–1540
- [50] Li H., Xu C., Li Q., Gao X., Sugano E., Tomita H., Yang L., Shi S.: Thioredoxin 2 offers protection against mitochondrial oxidative stress in H9c2 cells and against myocardial hypertrophy induced by hyperglycemia. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017; 18: 1958
- [51] Liao J., Wang K., Yao W., Yi X., Yan H., Chen M., Lan X.: Cloning, expression and antioxidant activity of a thioredoxin peroxidase from *Branchiostoma belcheri tsingtaunense*. *PLoS One*, 2017; 12: e0175162
- [52] Lillig C.H., Holmgren A.: Thioredoxin and related molecules – from biology to health and disease. *Antioxid. Redox Signal.*, 2007; 9: 25–47
- [53] Lu J., Papp L.V., Fang J., Rodriguez-Nieto S., Zhivotovsky B., Holmgren A.: Inhibition of mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: Implications for myricetin and quercetin anticancer activity. *Cancer Res.*, 2006; 66: 4410–4418
- [54] Lu Y., Wang X., Liu Z., Jin B., Chu D., Zhai H., Zhang F., Li K., Ren G., Miranda-Vizuet A., Guo X., Fan D.: Identification and distribution of thioredoxin-like 2 as the antigen for the monoclonal antibody MC3 specific to colorectal cancer. *Proteomics*, 2008; 8: 2220–2229
- [55] Maillet A., Pervaiz S.: Redox regulation of p53, redox effectors regulated by p53: A subtle balance. *Antioxid. Redox Signal.*, 2012; 16: 1285–1294
- [56] Maulik N., Das D.K.: Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1780: 1368–1382
- [57] Mukherjee A., Martin S.G.: The thioredoxin system: A key target in tumour and endothelial cells. *Br. J. Radiol.*, 2008; 81: S57–S68
- [58] Mura P., Camalli M., Bindoli A., Sorrentino F., Casini A., Gabbiani C., Corsini M., Zanello P., Rigobello M.P., Messori L.: Activity of rat cytosolic thioredoxin reductase is strongly decreased by trans-[bis (2-amino-5-methylthiazole) tetrachlororuthenate (III)]: First report of relevant thioredoxin reductase inhibition for a ruthenium compound. *J. Med. Chem.*, 2007; 50: 5871–5874
- [59] Ng H.L., Chen S., Chew E.H., Chui W.K.: Applying the designed multiple ligands approach to inhibit dihydrofolate reductase and thioredoxin reductase for anti-proliferative activity. *Eur. J. Med. Chem.*, 2016; 115: 63–74
- [60] Oehninger L., Küster L.N., Schmidt C., Muñoz-Castro A., Prokop A., Ott I.: A chemical-biological evaluation of rhodium (I) N-heterocyclic carbene complexes as prospective anticancer drugs. *Chem. Eur. J.*, 2013; 19: 17871–17880
- [61] Oguro A., Imaoka S.: Thioredoxin-related transmembrane protein 2 (TMX2) regulates the Ran protein gradient and importin-β-dependent nuclear cargo transport. *Sci. Rep.*, 2019; 9: 15296
- [62] Oka O.B., Bulleid N.J.: Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013; 1833: 2425–2429
- [63] Orlova T.N., Terenetskaya I.P.: Possible use of provitamin D3 photoisomerization for spectral dosimetry of bioactive antirachitic UV radiation. *J. Appl. Spectrosc.*, 2009; 76: 240–244
- [64] Ortego L., Cardoso F., Martins S., Fillat M.F., Laguna A., Meireles M., Villacampa M.D., Gimeno M.C.: Strong inhibition of thioredoxin reductase by highly cytotoxic gold (I) complexes. DNA binding studies. *J. Inorg. Biochem.*, 2014; 130: 32–37
- [65] Palanisamy R., Bhatt P., Kumaresan V., Chaurasia M.K., Gnanam A.J., Pasupuleti M., Kasi M., Arockiaraj J.: A redox active site

containing murrel cytosolic thioredoxin: Analysis of immunological properties. *Fish Shellfish Immunol.*, 2014; 36: 141–150

[66] Poet G.J., Oka O.B., van Lith M., Cao Z., Robinson P.J., Pringle M.A., Arnér E.S., Bulleid N.J.: Cytosolic thioredoxin reductase 1 is required for correct disulfide formation in the ER. *EMBO J.*, 2017; 36: 693–702

[67] Powis G., Wipf P., Lynch S.M., Birmingham A., Kirkpatrick D.L.: Molecular pharmacology and antitumor activity of palmarumycin-based inhibitors of thioredoxin reductase. *Mol. Cancer Ther.*, 2006; 5: 630–636

[68] Prast-Nielsen S., Huang H.H., Williams, D.L.: Thioredoxin glutathione reductase: Its role in redox biology and potential as a target for drugs against neglected diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1810: 1262–1271

[69] Ramanathan R.K., Stephenson J.J., Weiss G.J., Pestano L.A., Lowe A., Hiscox A., Leos R.A., Martin J.C., Kirkpatrick L., Richards D.A.: A phase I trial of PX-12, a small-molecule inhibitor of thioredoxin-1, administered as a 72-hour infusion every 21 days in patients with advanced cancers refractory to standard therapy. *Invest. New Drugs*, 2012; 30: 1591–1596

[70] Raninga P.V., Di Trapani G., Vuckovic S., Bhatia M., Tonissen K.F.: Inhibition of thioredoxin 1 leads to apoptosis in drug-resistant multiple myeloma. *Oncotarget*, 2015; 6: 15410–15424

[71] Ren X., Zou L., Lu J., Holmgren A.: Selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase and application of ebselen as a therapeutic. *Free Radic. Biol. Med.*, 2018; 127: 238–247

[72] Ren X., Zou L., Zhang X., Branco V., Wang J., Carvalho C., Holmgren A., Lu J.: Redox signaling mediated by thioredoxin and glutathione systems in the central nervous system. *Antioxid. Redox Signal.*, 2017; 27: 989–1010

[73] Rendón J.L., Miranda-Leyva M., Guevara-Flores A., Martínez-González J.J., Del Arenal I.P., Flores-Herrera O., Pardo J.P.: Insight into the mechanistic basis of the hysteretic-like kinetic behavior of thioredoxin-glutathione reductase (TGR). *Enzyme Res.*, 2018; 2018: 3215462

[74] Rhee S.G.: Overview on peroxiredoxin. *Mol. Cells*, 2016; 39: 1–5

[75] Rhee S.G., Woo H.A., Kil I.S., Bae S.H.: Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 4403–4410

[76] Rodriguez-Garcia A., Hevia D., Mayo J.C., Gonzalez-Menendez P., Coppo L., Lu J., Holmgren A., Sainz R.M.: Thioredoxin 1 modulates apoptosis induced by bioactive compounds in prostate cancer cells. *Redox Biol.*, 2017; 12: 634–647

[77] Roos G., Foloppe N., Van Laer K., Wyns L., Nilsson L., Geerlings P., Messens J.: How thioredoxin dissociates its mixed disulfide. *PLoS Comput. Biol.*, 2009; 5: e1000461

[78] Saccoccia, F., Angelucci F., Boumis G., Carotti D., Desiato G., Miele A.E., Bellelli A.: Thioredoxin reductase and its inhibitors. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2014; 15: 621–646

[79] Sandargo B., Thongbai B., Praditya D., Steinmann E., Stadler M., Surup F.: Antiviral 4-hydroxypleurogrisein and antimicrobial pleurotin derivatives from cultures of the nematophagous basidiomycete *Hohenbuehelia grisea*. *Molecules*, 2018; 23: 2697

[80] Sugiura Y., Araki K., Iemura S.I., Natsume T., Hoseki J., Nagata, K.: Novel thioredoxin-related transmembrane protein TMX4 has reductase activity. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 7135–7142

[81] Sweeney M., Coyle R., Kavanagh P., Berezin A.A., Re D.L., Zis-simou G.A., Koutentis P.A., Carty M.P., Aldabbagh F.: Discovery of anti-cancer activity for benzo [1,2,4] triazin-7-ones: Very strong correlation to pleurotin and thioredoxin reductase inhibition. *Bioorg. Med. Chem.*, 2016; 24: 3565–3570

[82] Tan S.X., Greetham D., Raeth S., Grant C.M., Dawes I.W., Perrone G.G.: The thioredoxin-thioredoxin reductase system can function in vivo as an alternative system to reduce oxidized glutathione in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 6118–6126

[83] Toledano M.B., Delaunay-Moisan A., Outten C.E., Igbaria A.: Functions and cellular compartmentation of the thioredoxin and glutathione pathways in yeast. *Antioxid. Redox Signal.*, 2013; 18: 1699–1711

[84] Tonissen K.F., Di Trapani G.: Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2009; 53: 87–103

[85] Ukuwela A.A., Bush A.I., Wedd A.G., Xiao Z.: Glutaredoxins employ parallel monothiol-dithiol mechanisms to catalyze thiol-disulfide exchanges with protein disulfides. *Chem. Sci.*, 2018; 9: 1173–1183

[86] Vandervore L.V., Schot R., Milanese C., Smits D.J., Kasteleijn E., Fry A.E., Pilz D.T., Brock S., Börklü-Yücel E., Post M., Bahi-Buisson N., Sánchez-Soler M.J., van Slegtenhous M., Keren B., Afenjar A. i wsp.: TMX2 is a crucial regulator of cellular redox state, and its dysfunction causes severe brain developmental abnormalities. *Am. J. Hum. Genet.*, 2019; 105: 1126–1147

[87] Watanabe R., Nakamura H., Masutani H., Yodoi J.: Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. *Pharmacol. Ther.*, 2010; 127: 261–270

[88] Wu C., Parrott A.M., Fu C., Liu T., Marino S.M., Gladyshev V.N., Jain M.R., Baykal A.T., Li Q., Oka S., Sadoshima J., Beuve A., Simmons W.J., Li H.: Thioredoxin 1-mediated post-translational modifications: Reduction, transnitrosylation, denitrosylation, and related proteomics methodologies. *Antioxid. Redox Signal.*, 2011; 15: 2565–2604

[89] Yoshioka J.: Thioredoxin superfamily and its effects on cardiac physiology and pathology. *Compr. Physiol.*, 2011; 5: 513–530

[90] Zeng H.H., Wang L.H.: Targeting thioredoxin reductase: Anticancer agents and chemopreventive compounds. *Med. Chem.*, 2010; 6: 286–297

[91] Zhang J., Zhang B., Li X., Han X., Liu R., Fang J.: Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase as potential anti-cancer agents: An update. *Med. Res. Rev.*, 2019; 39: 5–39

[92] Zhang J.J., Muenzner J.K., Abu El Maaty M.A., Karge B., Schobert R., Wölfl S., Ott I.: A multi-target caffeine derived rhodium (I) N-heterocyclic carbene complex: Evaluation of the mechanism of action. *Dalton Trans.*, 2016; 45: 13161–13168

[93] Zhu H., Tao X., Zhou L., Sheng B., Zhu X., Zhu X.: Expression of thioredoxin 1 and peroxiredoxins in squamous cervical carcinoma and its predictive role in NACT. *BMC Cancer*, 2019; 19: 865

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.