

УДК 577.321

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СУПЕРСЕМЕЙСТВА ТИОЛОВЫХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ

© 2013 г. Е. Г. Варламова*, М. В. Гольтяев, С. В. Новоселов, В. И. Новоселов, Е. Е. Фесенко

Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Московская обл., 142290

Поступила в редакцию 02.11.2012 г.

Принята к печати 17.01.2013 г.

Важная роль свободных радикалов и активных форм кислорода в процессах жизнедеятельности клетки сегодня не вызывает сомнений. Нарушение внутриклеточных процессов окисления–восстановления часто сопровождается развитием таких распространенных патологий, как диабет, инфаркт миокарда, нейродегенеративные, бронхолегочные, онкологические и другие заболевания. К настоящему времени описано большое количество ферментов-антиоксидантов, относящихся к различным системам редокс-биологии, среди которых ключевая роль принадлежит ферментам – представителям суперсемейства тиоловых оксидоредуктаз. В состав этого суперсемейства входят семейства тиоредоксинов и глутаредоксинов, перокси-редоксинов и протеиндисульфидизомераз, глутатионпероксидаз и ряд других белков. В дополнение к антиоксидантной функции, тиоловые оксидоредуктазы обладают способностью к утилизации гидропероксида для образования специфичных внутри- и межбелковых дисульфидных связей, что существенно расширяет спектр их функциональных возможностей. Таким образом, биохимическая характеристика и выяснение механизмов функционирования белков этого суперсемейства представляется актуальной проблемой редокс-биологии.

Ключевые слова: тиоловые оксидоредуктазы, глутатионпероксидазы, глутаредоксины, пероксиредоксины, тиоредоксины.

CHARACTERIZATION OF SOME THIOL OXIDOREDUCTASE FAMILY MEMBERS, *by E. G. Varlamova*, M. V. Goltyaev, S. V. Novoselov, V. I. Novoselov, E. E. Fesenko* (Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290, e-mail: admin@icb.psn.ru). There are no doubt about the important role of free radicals and reactive oxygen species in the processes of cell activity. The disturbances of intracellular redox processes are often accompanied with the development of such common pathologies as diabetes, myocardial infarction, neurodegeneration, broncho-pulmonary diseases, cancer, etc. To date, there are a large number of antioxidant enzymes related to different redox biology systems, the key role among them is played by enzymes belong to the thiol oxidoreductases superfamily, which consists of thioredoxin, glutaredoxin, peroxiredoxin, protein disulfide isomerase, glutathione peroxidase families, and a number of other proteins. In addition to the antioxidant function, thiol oxidoreductases display the ability to recycle of hydroperoxide to form specific disulfide bonds within and between proteins that significantly extends the range of their functionality. Therefore, biochemical characterization and elucidation of functional mechanisms of the superfamily proteins is a highly actual problem of redox biology.

Keywords: thiol oxidoreductase, glutathione peroxidase, glutaredoxin peroxiredoxin, thioredoxin.

DOI: 10.7868/S0026898413040149

ВВЕДЕНИЕ

Тиоловые оксидоредуктазы – это глобулярные белки с характерной тиоредоксин-подобной укладкой (фолдом), которая впервые была охарактеризована в 1984 году [1] и представляет собой последова-

тельность четырех β -слоев и трех фланкирующих α -спиралей, расположенных в следующем порядке: $\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 2$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ - $\alpha 3$ [2, 3]. На рис. 1а представлена структура этого тиоредоксинового фолда. Первоначально наличие тиоредоксиновой

Принятые сокращения: Cys – цистеин; Sec – селеноцистеин; GPx – глутатионпероксидаза; GSH – глутатион восстановленный; GSSG – глутатион окисленный; PHGPx – фосфолипидгидропероксид-глутатионпероксидаза; NPHGPx – неселеновая фосфолипидгидропероксид-глутатионпероксидаза; NS-GPx – неселеновые глутатионпероксидазы; Grx – глутатионредуктаза; GST – глутатион-S-трансфераза; Prx – пероксиредоксин; AhpC – алкильные гидропероксидредуктазы; Trx – тиоловые пероксидазы; АФК – активные формы кислорода.

*Эл. почта: lenvarlamova@rambler.ru

укладки обнаружили у шести семейств белков: тиоредоксины [4, 5], глутаредоксины [6–9], глутатион-S-трансферазы [10–13], глутатионпероксидазы, протеиндисульфидизомеразы [14] и пероксиредоксины. Однако, несмотря на схожесть третичной структуры этих белков, их биологические и каталитические функции различны.

Еще одна характерная особенность этого суперсемейства – наличие в составе каталитического центра консервативного мотива СХХС (последовательность, в которой два цистеина разделены двумя другими аминокислотами), ТХХС или СХХС/Т (один из цистеинов замещен на серин или треонин [15]). Этот каталитический центр локализован в частично экспонированной петле между С-концевой α 1-спиралью и N-концевым β 1-слоем (рис. 1б).

В зависимости от того, какие аминокислоты разделяют консервативные Cys в СХХС-мотиве, эти ферменты могут быть либо восстановителями (тиоредоксины, пероксиредоксины), либо окислителями (протеиндисульфид-изомеразы). Каталитический центр селен-содержащих оксидоредуктаз несет редокс-активный Sec [16]. Их цистеиновые гомологи приблизительно в 100–1 000 раз менее активны, что объясняется высокой реакционной способностью Sec [17].

ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ

Семейство глутатионпероксидаз содержит большое количество изоферментов, которые катализируют восстановление пероксида водорода или органических гидропероксидов до воды или соответствующих спиртов, используя в качестве донора электронов восстановленный глутатион. В природе представлены как селен-содержащие глутатионпероксидазы, так и цистеиновые формы этих ферментов.

У млекопитающих идентифицировано восемь глутатионпероксидаз, четыре из которых селен-содержащие: GPx-1, GPx-2, GPx-3 и GPx-4. Глутатионпероксидазную активность открыли в 1957 году – авторы предположили, что функция глутатионпероксидаз заключается в защите эритроцитов от гемолиза, вызванного окислением [18]. Фермент специфически восстанавливал пероксид водорода через восстановленный глутатион. Эта глутатионпероксидаза была названа “классической” или GPx-1. Показано, что GPx-1 представляет собой тетрамерный белок, содержащий четыре одинаковых субъединицы, каждая из которых имеет один селеноцистеиновый остаток, и восстанавливает большое число органических гидропероксидов [18–20].

GPx2 – фермент желудочно-кишечного тракта, локализуется в цитозоле и ядре клетки. Суб-

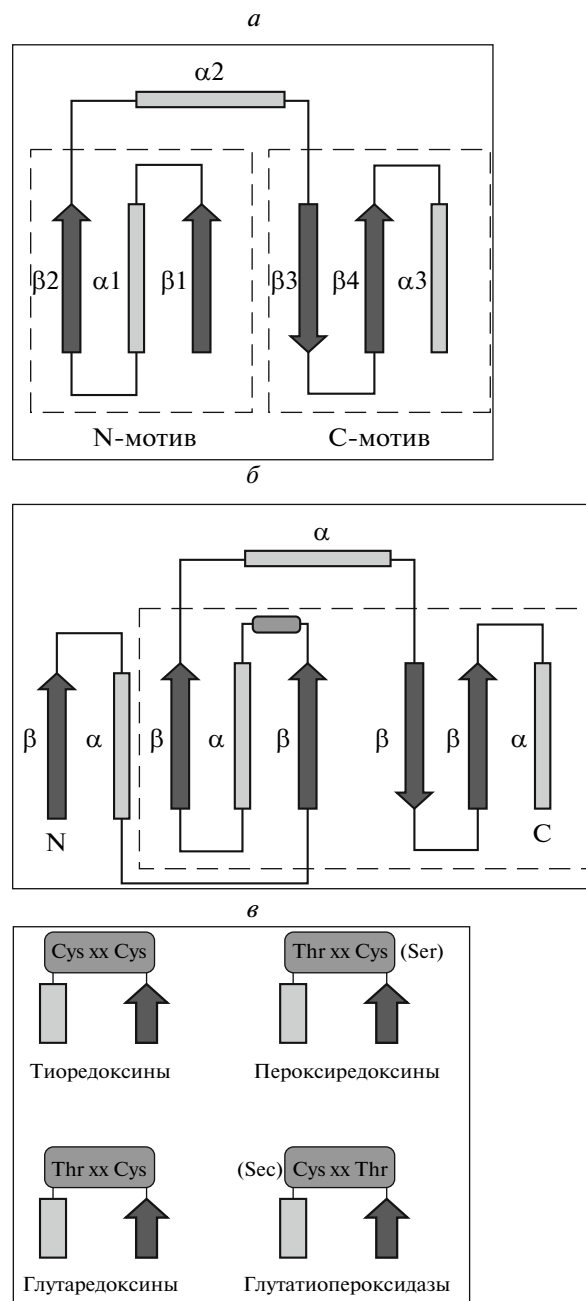


Рис. 1. Расположение элементов вторичной структуры в тиоредоксине и белках с тиоредоксин-подобной укладкой. *a* – Схематическое изображение последовательного расположения элементов вторичной структуры (α -спиралей и β -слоев) в тиоредоксине (тиоредоксиновый фолд). *б* – Расположения элементов вторичной структуры (α -спиралей и β -слоев) в белках с тиоредоксин-подобной укладкой. Пунктирной линией ограничена область, соответствующая структуре тиоредоксиновой укладки, прямоугольником обозначено расположение активного центра белков с тиоредоксин-подобной укладкой. *в* – Каталитические центры некоторых тиоловых оксидоредуктаз.

стратная специфичность этой глутатионпероксидазы подобна GPx-1 и включает пероксид водорода, трет-бутилгидропероксид, гидроперекиси

линолевой кислоты, но не фосфатидилхолина [21]. Локализация GPx-2 дает основание полагать, что этот селен-содержащий белок участвует в защите организма от окислительного стресса, вызванного действием прооксидантов или микрофлоры кишечника. Показано, что экспрессия GPx-2 усилена при раке желудка-кишечного тракта [22, 23]. Так, при двойном нокауте GPx-1/GPx-2 у мышей постепенно развивался энтероколит и впоследствии рак кишечника, но если хотя бы один из аллелей *gpx-2* гена оставался нормальным, то у мышей воспаления кишечника не наблюдалось [24, 25].

Фермент GPx3 —единственный представитель данного семейства, который представляет собой секреторный белок, и 20% селена плазмы крови приходится на его долю [26]. Основным источником GPx-3 в плазме крови служат почки, фермент секретируется эпителиальными клетками проксимальных канальцев и париетальными клетками Боуменовской капсулы и выбрасывается в кровь [27]. Тем не менее, в некоторых тканях детектируют мРНК этого белка, где, скорее всего, он выступает в качестве локального источника внеклеточной антиоксидантной активности. Так GPx-3 — один из трех преобладающих в сердце селен-содержащих белков, где он выполняет защитную функцию от окислительного повреждения внеклеточного матрикса в норме и в условиях окислительного стресса [28]. В условиях *in vivo* не был идентифицирован восстановитель GPx-3, однако исследования *in vitro* показали, что фермент может использовать глутатион для восстановления пероксида водорода или трет-бутила [29]. Кроме того, тиоредоксин и глутаредоксин могут выступать в качестве восстановительных субстратов для GPx-3 [30]. Показано, что снижение активности этого фермента приводит к гиперактивности тромбоцитов и повышенному риску тромбозов [31].

Четвертая глутатионпероксидаза (GPx-4), называемая также фосфолипидгидропероксид-глутатионпероксидазой (PHGPx), по четвертичной структуре представляет собой мономерный белок, содержащий Sec в активном центре. GPx-4 способна восстанавливать широкий спектр гидропероксидов: от пероксида водорода до гидропероксидных групп сложных липидов биологических мембран [32], что свидетельствует об антиоксидантных свойствах этой глутатионпероксидазы. Высокий уровень гонадотропин-зависимой экспрессии GPx-4 в семенниках [33, 34] позволяет расширить представления о функциональной значимости этого фермента. В семенниках ген *gpx-4*, реализуя альтернативные пути использования стартовых кодонов, экспрессируется в трех различных формах: цитозольной, ядерной и митохондриальной [35, 36].

Существует ряд доказательств, свидетельствующих о том, что ядерная глутатионпероксидаза участвует в процессах конденсации мужского гаплоидного генома, скорее всего, путем формирования дисульфидных мостиков в протаминах [32, 37–39]. Митохондриальная изоформа GPx-4 локализуется преимущественно в средней части зрелого сперматозоида, выполняя роль структурного компонента митохондриальной капсулы [40]. Здесь GPx-4 находится в инактивированной форме в составе высокомолекулярных комплексов с другими белками капсулы [41]. Выключение гена *mgpx-4* нарушает подвижность сперматозоидов, но не оказывает негативного влияния на развитие, главным образом, их ядер, содержащих гаплоидный геном. Цитозольная GPx-4 (сGPx-4) представлена самой короткой изоформой белка. Предполагают, что в клетках Лейдига этот фермент вовлечен в антиоксидантную защиту синтеза стероидных гормонов [42]. Имеются данные о том, что делеция в гене *cgpx-4* значительно снижает количество сперматозоидов, следовательно, изоформа сGPx-4 необходима для нормального роста половых клеток в семенниках. В то же время у мышей с инактивированной сGPx-4 развитие и размножение протекают без отклонений от нормы [43].

Два других изофермента, GPx-5 и GPx-6, имеют много общего с GPx-3, однако первый из них — это цистеин-содержащий белок, в то время как GPx-6 (у человека и свиньи) представлен селен-содержащими формами. У млекопитающих белок GPx-5 впервые обнаружен в придатке яичка и сперматозоидах [44]. Относительно недавно показано, что этот фермент может находиться как в свободной форме, так и в ассоциированной с перемещением сперматозоидов в просвет придатков семенников [45–47], что свидетельствует, скорее всего, об участии GPx-5 в защите созревающих сперматозоидов от действия активных форм кислорода (АФК). К настоящему времени собрано очень мало информации относительно GPx-6. Известно только, что мРНК этого белка экспрессируется исключительно в обонятельном эпителии [48], белок ядерно-цитоплазматический и не локализуется в митохондриях [49].

Относительно недавно у млекопитающих открыта новая фосфолипидгидропероксид-глутатионпероксидаза, в активном центре которой находится Cys, а не Sec. Этот неселеноцистеиновый фермент был назван NPHGPx и отнесен к седьмой группе глутатионпероксидаз млекопитающих. Белок имеет молекулярную массу приблизительно 22 кДа, обладает низкой глутатионпероксидазной активностью в условиях *in vitro*. мРНК этого белка экспрессируется в различных тканях, в том числе в развивающихся молочных железах, где играет важную роль в борьбе с окис-

лительным стрессом, возникающем в процессе метаболизма полиненасыщенных жирных кислот [50]. NPHGPx может взаимодействовать с липофильными субстратами, например, с подверженными перекисному окислению фосфолипидами и холестерином [51, 52].

Еще один фермент рассматриваемого нами семейства – GPx-8, относительно которого известно только то, что он относится к трансмембранным белкам типа I и имеет короткий N-концевой цитоплазматический участок и каталитический домен, локализованный в эндоплазматическом ретикулуле [53].

Наличие селена в активном центре глутатионпероксидаз обуславливает повышение их ферментативной активности на 2–3 порядка по сравнению с их цистеин-содержащими гомологами [54, 55]. Ферментативный механизм с участием селен-содержащих глутатионпероксидаз можно рассмотреть на примере классической Gpx-1. Детоксикация пероксида водорода этой глутатионпероксидазой происходит путем двухсубстратного ферментативного механизма типа “пинг-понг”. Ферментативное восстановление перекисей включает формирование промежуточных стабильных модификаций в активном сайте, содержащем селеноцистеин [56–61]. Взаимодействие глутатионпероксидазы с пероксидом водорода приводит к окислению группы Se-H в активном сайте фермента до Se-OH, после чего фермент восстанавливается одной молекулой глутатиона GSH с образованием промежуточного продукта Se-SG [56, 58, 61]. Вторая молекула глутатиона взаимодействует со связью Se-S, что приводит к восстановлению активного сайта глутатионпероксидазы и окислению глутатиона (GSSG), после чего он восстанавливается NADPH-зависимой глутатионредуктазой. Все эти реакции можно описать тремя уравнениями, приведенными на рис. 2а.

Многими авторами показано, что неселеновые глутатионпероксидазы (NS-GPx) имеют низкую аффинность к глутатиону и проявляют тиоредоксинпероксидазную активность. Схематическое изображение механизма каталитических реакций с участием NS-GPx представлено на рис. 2б. Цистеиновый остаток активного центра этих ферментов окисляется под действием пероксида водорода или органических гидропероксидов, после чего взаимодействует с другим остатком цистеина, располагающимся в высококонсервативной последовательности глутатионпероксидаз PCNQE. После этого образовавшаяся дисульфидная связь восстанавливается тиоредоксином. Кроме того показано, что некоторые NS-GPx могут действовать подобно пероксиредоксинам Q и II типов. Это может объясняться сходными структурными особенностями обоих классов ферментов, которые

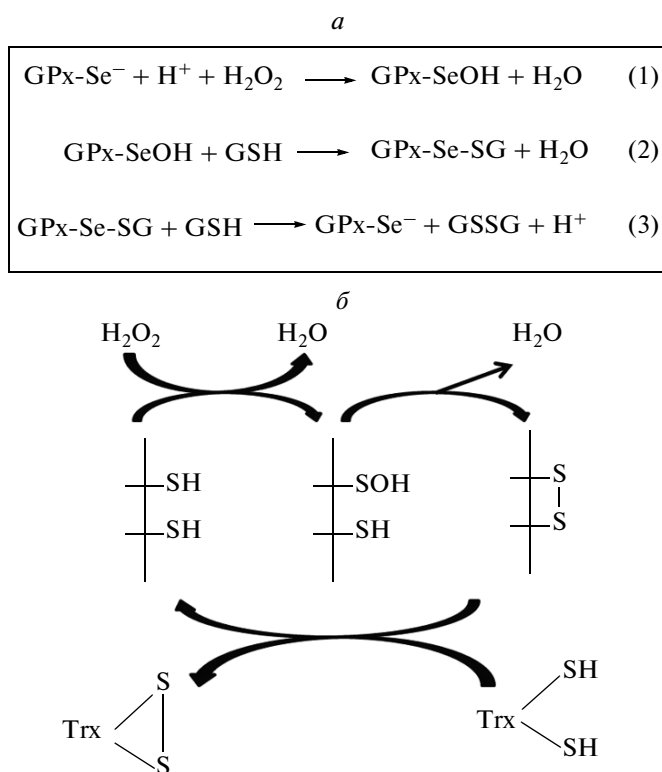


Рис. 2. Каталитические реакции с участием селен-содержащих и неселеновых глутатионпероксидаз. *a* – Каталитические реакции с участием селен-содержащих глутатионпероксидаз. *б* – Механизм каталитических реакций с участием неселеновых глутатионпероксидаз.

относятся к суперсемейству белков с тиоредоксиновой укладкой [62].

ГЛУТАРЕДОКСИНЫ

Глутаредоксины – тиоловые оксидоредуктазы, участвующие в катализе разнообразных GSH-зависимых тиол-дисульфидных обменных реакций, в том числе реакций глутатионилирования и деглутатионилирования белков, в превращениях рибонуклеотидредуктаз и восстановлении дигидроаскорбатов и арсенатов; а некоторые глутаредоксины участвуют в гомеостазе FeS [63, 64]. Среди всех каталитических активностей глутаредоксина наибольшее внимание заслуживает белковое деглутатионилирование (образование дисульфидной связи между белком и глутатионом), поскольку оно играет регуляторную роль в трансдукции редоксигнала и сульфгидрильного гомеостаза. Глутатионилирование – посттрансляционная модификация, которая осуществляется по цистеиновым остаткам в некоторых белках при нормальных условиях (β -актин [65], митохондриальный комплекс II [66]); для других белков это переходное состояние в процессе окислительного стресса, на-



Рис. 3. Схематическое представление направления потока восстановительного эквивалента (электронов) в системе глутаредоксина.

пример, при ишемии-реперфузии (α -актин [67], GAPDH [68], митохондриальный комплекс I [69]).

Впервые система глутаредоксина описана в 1976 году в качестве дитиоловой водородной донорной системы для рибонуклеотидредуктазы в условиях отсутствия тиоредоксина 1 (Trx-1) у *E. coli* [70]. В системе глутаредоксина электроны переносятся от NADPH на глутатионредуктазу, затем на глутатион и затем на один из известных к настоящему времени глутаредоксинов (Grx-1, Grx-2 и Grx-3) (рис. 3).

К настоящему времени известно большое количество изоформ глутаредоксинов у разных организмов. На основании их структуры и каталитических свойств глутаредоксины отнесены к трем группам [71]. Первая из них представлена «классическими» глутаредоксинами — белками массой 10 кДа, имеющими CXXC мотив (обычно CPYC) и тиоредоксиновую/глутаредоксиновую укладку. К этой группе относятся Grx-1 и Grx-3 *E. coli*. Во вторую группу входят белки, структурно близкие к глутатион-S-трансферазе (GST), но имеющие глутаредоксин-оксидоредуктазную активность. К общим структурным особенностям этого класса глутаредоксинов и глутатион-S-трансферазы относятся два домена, первый из которых характеризуется наличием активного сайта и тиоредоксиновой укладки, а второй содержит α -спираль. Один из представителей этого класса глутаредоксинов — глутаредоксин 2 (Grx-2) *E. coli*, который имеет третичную структуру, сильно похожую на GST [72]. Основное его отличие от GST — наличие дитиоловой последовательности в активном сайте CPYC, что обуславливает глутаредоксиновую активность фермента. Другие белки, которые структурно можно отнести к этой категории, даже при отсутствии значительной гомологии в аминокислотной последовательности и при наличии только одного цистеина в активном центре, — это человеческие GST тета-класса, GST- ω -1 (GSTO1), GST тета-подобный мышинный белок стресса (p28), человеческий хлорный межклеточный канал (CLIC1) [72]. Все они относятся к белкам детоксикации или стрессовым белкам. Третья группа глутаредоксинов отличается наличием монотиолового активного участка (CGFS). Монотиоловые глутаредоксины идентифицированы у дрожжей (yGrx3, yGrx4, yGrx5) и у человека (PICOT) [73, 74].

К настоящему времени описано три глутаредоксина человека. Это цитозольный глутаредоксин Grx-1 с последовательностью Cys-Pro-Tyr-Cys в каталитическом центре и две митохондриальные формы: Grx-2 с Cys-Ser-Tyr-Cys в активном центре и Grx-5 с одним остатком цистеина в последовательности Cys-Gly-Phe-Ser.

Показано, что Grx-1, белок массой 12 кДа, восстанавливает дисульфиды путем дитиолового механизма и играет важную роль в тиол-дисульфидном обмене, благодаря чему вовлечен в процессы дифференцировки клеток, регуляцию активности транскрипционных факторов и апоптоз [75–77].

Grx-2, белок массой 14 кДа, имеет две формы, представляющие собой продукты альтернативного сплайсинга: Grx2 α и Grx2 β , — первый из которых локализован в митохондриях, второй — в ядре. Известно, что Grx-2 участвует в регуляции уровня АФК посредством катализа обратимого S-глутатионилирования митохондриального комплекса I и белков внутренней мембраны [78, 79]. Окисленная форма Grx-2 восстанавливается и глутатионом, и тиоредоксин редуктазой 2. Фермент Grx-2 участвует в защите клеток от апоптоза, вызванного формированием свободных радикалов комплексом цитохрома *c* и кардиолипина (комплекс обладает пероксидазной активностью). Кроме того, сверхэкспрессия гена *grx2* в клетках линии HELA приводит к заметному снижению чувствительности этих клеток к апоптозу, вызванному 2-дезоксид-Д-глюкозой или доксорубицином [80, 81].

У человека белок Grx-5, подобно дрожжевому и бактериальному, участвует в поддержании гомеостаза железа. Так, нокаут гена *grx5* приводит к окислительному стрессу, вызванному накоплением железа в клетках [82].

ПЕРОКСИРЕДОКСИНЫ

Пероксиредоксины (Peroxiredoxins, Prxs, КФ 1.11.1.15) — большое семейство тиоловых антиоксидантных ферментов с цистеин-зависимой пероксидазной активностью в отношении пероксида водорода и других гидропероксидных субстратов.

Активность Prxs обусловлена наличием консервативных остатков Cys в N-концевом и C-концевом участках полипептидной цепи. N-концевой Cys называется пероксидазным, S_P (peroxidatic cysteine), а C-концевой – восстанавливающим, S_R (resolving cysteine). Аминокислоты, формирующие пероксидазный каталитический центр, для всех пероксиредоксинов высококонсервативны [83].

К семейству пероксиредоксинов относят шесть подсемейств (классов) ферментов: AhpC-Prx1 (typical 2-Cys Prxs, типичные 2-Cys пероксиредоксины) млекопитающих и AhpC (алкильные гидропероксидредуктазы) микроорганизмов, BCP-PrxQ, Trx, Prx-5 (atypical 2-Cys Prxs, атипичные 2-Cys пероксиредоксины) млекопитающих, Prx-6 (1-Cys Prxs, 1-Cys пероксиредоксины) млекопитающих и AhpE [84].

Подсемейство AhpC-Prx1 многочисленно и широко представлено как у архей и бактерий, так и у всех классов эукариот [85]. К этому подсемейству относятся бактериальные AhpC-белки (*Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium*, *Amphibacillus xylanus*, *Mycobacterium tuberculosis*), трипаредоксинпероксидазы (*Crithidia fasciculata*, *Trypanosoma cruzi*), пероксиредоксины растений, белки TSA1 и TSA2 (тиол-специфические антиоксиданты) дрожжей, пероксиредоксины человека PrxI, II, III, и IV. Ферменты этого подсемейства очень эффективно реагируют с пероксидом водорода [86].

Подсемейство BCP-PrxQ включает ферменты BCP (bacterioferritin comigratory protein, тиоредоксин-зависимый мигрирующий с бактериоферритином белок) микроорганизмов (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aeropyrum pernix*, *Sulfolobus solfataricus*, *Xanthomonas campestris*) и растительные PrxQ [85]. Большинство белков подсемейства – мономеры, однако встречаются и димерные представители.

Подсемейство Trx наименее филогенетически разнообразно и немногочисленно, его представители встречаются только у эубактерий. Название Trx происходит от термина “thiol peroxidase” (тиоловые пероксидазы), кроме того белки, относящиеся к этому подсемейству, также называют p20 и относят к “группе E” [87] или Prx2-группе [88].

Подсемейство Prx-5, получившее свое название от пероксиредоксина PrxV человека, представлено атипичными 2-Cys пероксиредоксинами.

Подсемейство Prx-6 также называется 1-Cys Prxs (1-Cys пероксиредоксины), его представители – димерные белки, имеющие один консервативный остаток цистеина в N-концевой области.

Подсемейство AhpE включает белки, идентифицированные только у аэробных грамположительных бактерий и актиномицетов; в его состав входят 1-Cys- и 2-Cys- варианты пероксиредоксинов [85].

Пероксиредоксины млекопитающих разделяют на три класса в зависимости от количества остатков цистеина в активном центре фермента: типичные 2-Cys пероксиредоксины, атипичные 2-Cys пероксиредоксины и 1-Cys пероксиредоксины. В этих классах, в свою очередь, выделяют шесть подклассов: PrxI, PrxII, PrxIII, PrxIV (2-Cys), PrxV (атипичные 2-Cys) и PrxVI (1-Cys) [83].

Ферменты, входящие в подсемейство типичных 2-Cys пероксиредоксинов, гомодимерны и имеют два консервативных остатка Cys [89], расположенных в N- и C-концевых участках белков. Установлено, что эти пероксиредоксины способны к редокс-зависимой олигомеризации – от димеров до декамеров [90]. Атипичные 2-Cys пероксиредоксины – это мономерные белки [91], содержащие единственный консервативный остаток Cys в N-концевой области, однако для проявления каталитической активности им необходим второй остаток Cys. Подсемейство 1-Cys пероксиредоксинов представлено димерными белками с одним консервативным остатком Cys и еще одним в N-концевой области.

Особенность каталитического механизма всех пероксиредоксинов – окисление тиоловой R-SH группы редокс-активного цистеина каталитического центра с образованием R-SOH субстрата. Основное отличие между тремя классами пероксиредоксинов заключается в механизме восстановления R-SOH до R-SH [89]. На первой стадии, общей для всех трех классов ферментов, цистеин активного центра пероксиредоксина взаимодействует с субстратом, подверженным перекисному окислению, что приводит к образованию S-гидроксицистеина (сульфеновой кислоты), после чего происходит вторая стадия реакций, сопровождающаяся восстановлением цистеина активного центра. Для типичных 2-Cys пероксиредоксинов на последней стадии S-гидроксицистеин одной субъединицы (окисленный пероксидазный цистеин, S_POH) взаимодействует с S_R -остатком, расположенным на C-конце второй субъединицы, образуя межсубъединичную дисульфидную связь, которая далее восстанавливается одним из клеточных тиоловых восстановителей, таких как тиоредоксин или трипаредоксин [92]. У атипичных 2-Cys пероксиредоксинов оба остатка Cys находятся в одной полипептидной цепи, таким образом, на второй стадии ферментативной реакции образуется внутренняя дисульфидная связь. Для восстановления дисульфидной связи атипичные пероксиредоксины используют тиоредоксин в качестве донора электронов [91]. Поскольку 1-Cys пероксиредоксины имеют единственный остаток Cys, то молекула восстановителя напрямую взаимодействует с его окисленной формой [93]. Редокс-партнеры 1-Cys пероксиредоксинов включают глутатион, липоевую кислоту и циклофилин

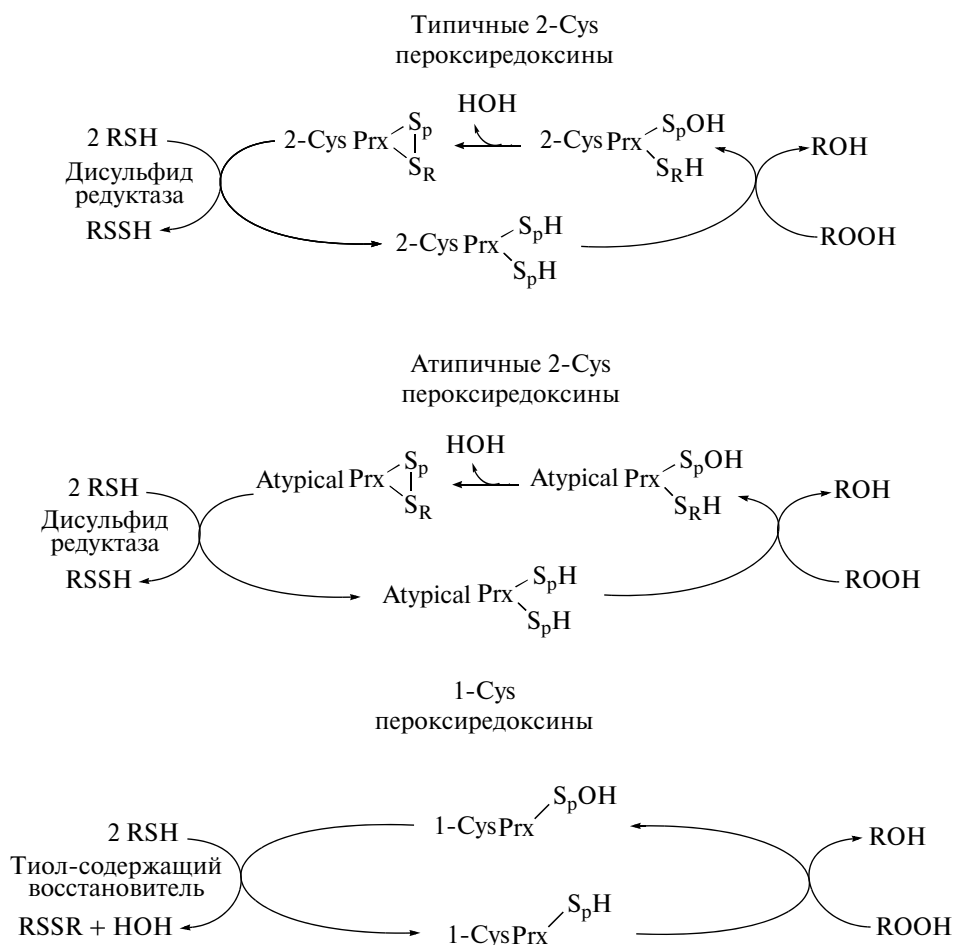


Рис. 4. Каталитический цикл пероксиредоксинов. S_p – пероксидазный цистеин, S_R – восстанавливающий цистеин, S_pH – восстановленный пероксидазный цистеин, S_RH – восстановленный восстанавливающий цистеин, S_pOH – окисленный пероксидазный цистеин. Адаптированный вариант [83].

[87]. Каталитический цикл пероксиредоксинов, представлен на рис. 4.

Структура пероксиредоксинов характеризуется тиоредоксиновой укладкой, возможны вариации длины петель и протяженности N- и C-концевых областей [88]. Ядро структуры включает в себя 7 β -структур и 5 α -спиралей. Пять центральных антипараллельных β -структур ($\beta 5$ – $\beta 4$ – $\beta 3$ – $\beta 6$ – $\beta 7$) формируют β -лист, который с одной стороны прикрывается β -шпилькой и двумя α -спиралями ($\alpha 1$ – $\alpha 2$ – $\alpha 4$), а с другой – тремя α -спиралями ($\alpha 3$, $\alpha 5$ и $\alpha 6$). Пероксидазный остаток цистеина S_p находится на первом витке $\alpha 2$ -спирали [90].

Экспрессия генов пероксиредоксинов имеет тканевую специфичность и может быть вызвана как окислительным стрессом [94, 95], так и действием киназ [96] и гормонов [97, 98].

В геноме человека идентифицировано 6 генов, кодирующих следующие пероксиредоксины: PrxI, PrxII, PrxIII, PrxIV, PrxV и PrxVI.

PrxI обладает молекулярной массой 22 кДа, его много в тканях человека [99, 100], в клетках локализуется как в ядре, так и в цитозоле. Уровень экспрессии фермента зависит как от возраста [101], так и от наличия различных патологий [102–105]. Белок участвует в антиоксидантной защите эритроцитов: у мышей, нокаутных по гену *prx1*, развивалась гемолитическая анемия [106] и на 15% снижалась продолжительность жизни [107].

Подобно PrxI, снижение уровня экспрессии PrxII в клетках приводит к возникновению в них чувствительности к апоптозу. У нокаутных животных также появлялись симптомы гемолитической анемии и повышалась вероятность развития гематопэтических опухолей. В клетке PrxII находится как в цитозоле, так и в мембран-связанном состоянии.

PrxIII локализуется в митохондриях и также участвует в антиоксидантной защите клеток. Экспрессия гена *prx3* индуцируется окислительным стрессом. Показано, что снижение уровня PrxIII

приводит к изменениям в морфологии митохондрий, уменьшению их массы и изменению мембранного потенциала [95].

PrxIV локализован не только в клетках, но и в межклеточном пространстве и защищает эндотелиальные клетки от внеклеточных активных форм кислорода. Восстановленная форма способна связываться с поверхностью клеток, окисленная форма теряет эту способность.

PrxV – представитель атипичных 2-Cys пероксиредоксинов – отличается от других ферментов семейства механизмом ферментативного катализа, структурой и внутриклеточной локализацией. PrxV – мономерный белок с одним консервативным остатком Cys48 и двумя дополнительными Cys в позициях 73 и 152. Cys48 и Cys152 образуют внутреннюю дисульфидную связь после окисления пероксидазного цистеина. Повышение экспрессии PrxV наблюдается при патологических процессах [108].

PrxVI относится к классу 1-Cys пероксиредоксинов и содержит один Cys в положении 47. Этот белок обнаружен во всех тканях, но наиболее высокое содержание выявлено в обонятельном эпителии, эпителии трахеи и бронхов, желудочно-кишечном тракте и ротовой полости, а также в клетках печени и поджелудочной железы. Секреторный водорастворимый PrxVI впервые выделен в чистом виде из обонятельного эпителия крысы [109, 110]. Биохимические исследования показали, что PrxVI в присутствии некоторых тиолов обладает способностью нейтрализовать как органические, так и неорганические перекиси, и его протекторная активность определяется в основном пероксидазной активностью [111, 112]. Характерная особенность PrxVI заключается в том, что его пероксидазная активность проявляется при таких низких концентрациях перекиси (5–100 мкМ), при которых другие ферменты-антиоксиданты малоэффективны [111]. Помимо пероксида водорода этот фермент восстанавливает алкил-гидропероксиды и пероксиды фосфолипидов. В каталитических реакциях участвует только один Cys активного центра, кроме того, PrxVI не использует в качестве восстановителя тиоредоксин (в отличие от PrxI, II, III, IV и V). Показано, что редокс-партнерами PrxVI могут быть глутатион, дегидролипоевая кислота и циклофилин [113], однако до сих пор нет данных о природных восстановителях этого белка. Так как PrxVI обладает антиоксидантной активностью в межклеточной среде, он оказывает терапевтическое действие при лечении ожогов верхних дыхательных путей и заживлении резаных ран [114]. Нокаутные мыши, лишённые данного белка, жизнеспособны, однако более чувствительны к окисли-

тельному стрессу и, в частности, к гипероксии [115].

ТИОРЕДОКСИНЫ

Тиоредоксины (Trxs) – семейство небольших (около 12 кДа) белков, катализирующих окислительно-восстановительные реакции путем дитиол-дисульфидного обмена с участием двух редокс-активных остатков Cys, разделённых парой аминокислот (CxxC-мотив). Тиоредоксиновая укладка этих белков определяет расположение N-концевого Cys каталитического центра в непосредственной близости от второго остатка Cys. Основная функция тиоредоксинов – восстановление дисульфидных связей в белках [116]. Реакция протекает в два этапа: тиол N-концевого Cys тиоредоксина атакует дисульфидную связь белка-мишени, освобождая свободный тиол и формируя дисульфидную связь с остатком Cys белка-мишени. Далее тиоловая группа C-концевого Cys тиоредоксина разрушает дисульфидную связь комплекса тиоредоксин-белок, восстанавливая белок-мишень, сам тиоредоксин при этом окисляется [117], после чего ферментативно восстанавливается тиоредоксин редуктазой (Trx-R) в NADPH-зависимой реакции. Схема оксидоредуктазной активности тиоредоксиновой системы представлена на рис. 5.

Тиоредоксины встречаются у всех свободноживущих организмов. Так, у *E. coli* геном кодирует два тиоредоксина: Trx-1 и Trx-2 и единственную тиоредоксин редуктазу. Trx-1 был обнаружен благодаря его способности выступать в качестве восстанавливающего субстрата для рибонуклеотидредуктазы – ключевого фермента в синтезе ДНК [118]. Кроме того, Trx-1 эффективно восстанавливает фосфоаденозинфосфосульфатредуктазы [119] и метионинсульфоксидредуктазу [120].

У растений обнаружено 20 изоформ тиоредоксинов [121], на основании различий в их первичной структуре различают Trxf, Trxh, Trxm, Trxo, Trxh и Trxu тиоредоксины. Сравнение их с последовательностями тиоредоксинов прокариот и эукариот показало, что тиоредоксины *m*, *x*, и *u* имеют прокариотическое происхождение [122, 123], а *f*, *h*, и *o* – эукариотическое [124].

Геном человека включает два гена, кодирующих цитозольный тиоредоксин (Trx-1) и митохондриальный тиоредоксин-предшественник (Trx-2), и представлены эти гены единичными копиями. Помимо этого в геноме человека содержатся два гена, кодирующих тиоредоксинредуктазы: цитозольную TrxR1 [125] и митохондриальную TrxR2 [126]. Геном позвоночных также кодирует несколько гомологов тиоредоксина: SpTrx1 [127], SpTrx2 [128] и белок Picot, состоящий из двух тиоредоксин-подобных доменов, двух глутаредоксин-подоб-

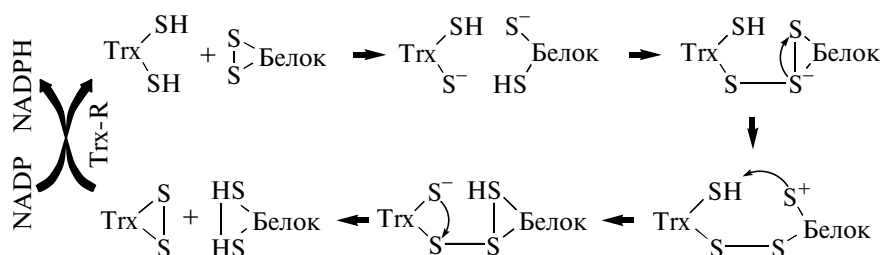


Рис. 5. Схема оксидоредуктазной активности тиоредоксиновой системы. Тиол N-концевого цистеина тиоредоксина (Trx) атакует дисульфидную связь в белке-мишени, освобождая свободный тиол и формируя дисульфидную связь с тиолом цистеина белка-мишени (верхний ряд реакций). Далее тиол С-концевого цистеина Trx разрушает дисульфидную связь, восстанавливая белок-мишень. Trx при этом окисляется (нижний ряд реакций). Окисленный Trx ферментативно восстанавливается тиоредоксинредуктазой (Trx-R) в NADPH-зависимой реакции.

ных доменов и одного Trp14-домена. [129, 130]. Нокаутные мыши, лишённые Trx-1, погибают на ранних стадиях эмбрионального развития [131], что показывает значимость Trx-1 для млекопитающих и его незаменимость другими редуктазами. При инактивации Trx-1 эмбрион развивается только 8 сут [132] и наблюдаются патологии в развитии печени. Нокаут по Trx-2 также ведет к летальному исходу: зародыши погибают на 11 сут вследствие мутации митохондрий [133]. При инактивации митохондриальной тиоредоксинредуктазы эмбрион гибнет на 13 сут [134].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аэробные клетки постоянно подвергаются атаке активными формами кислорода различного происхождения, главная роль в нейтрализации которых принадлежит антиоксидантам. Внутриклеточное тиоловое редокс-состояние – это критический медиатор целого ряда метаболических, сигнальных и транскрипционных процессов. Для нормального функционирования организма необходим устойчивый баланс между окислительными и восстановительными реакциями, в противном случае развивается окислительный стресс – состояние, характеризующееся избытком активных форм кислорода.

В настоящее время считается общепризнанным, что острые патологические процессы в организме человека сопровождаются мощным окислительным стрессом в различных тканях организма, и это один из основных факторов развития острых воспалительных процессов. Широкий спектр тяжелых заболеваний, в патогенезе которых важную роль играют окислительный стресс, заставляют искать пути эффективной нейтрализации повышенного уровня АФК, так как в подавляющем большинстве случаев ситуацию можно существенно скорректировать, используя антиоксидантные препараты. В медицине широко

используются лекарственные препараты антиоксидантного действия как природного, так и синтетического происхождения. Однако в большинстве случаев они оказываются относительно малоэффективными и используются как дополнительные лекарственные препараты или как профилактическое средство. Основная причина такой ситуации – относительно слабая эффективность используемых соединений в нейтрализации активных форм кислорода.

Так как АФК в основном представлены (кроме супероксид-радикалов) органическими и неорганическими гидропероксидами, основная роль в их утилизации в организме принадлежит охарактеризованным в данном обзоре тиоловым оксидоредуктазам: тиоредоксинам, тиоредоксинредуктазам, пероксиредоксинам, глутатионпероксидазам, глутатионредуктазам и глутаредоксинам. Таким образом, известны ключевые ферменты в организме человека, которые в принципе способны нейтрализовать токсическое действие АФК. Это позволило предположить, что экзогенное применение ферментов-антиоксидантов может быть использовано для существенного ускорения лечения острых воспалительных процессов, тем более эффективность этих ферментов на несколько порядков выше, чем антиоксидантная активность широко используемых низкомолекулярных соединений. Действительно, к настоящему времени имеется ряд работ по экзогенному применению ферментов-антиоксидантов при лечении некоторых патологий, сопровождающихся окислительным стрессом. В частности, в модельных экспериментах на животных показана высокая эффективность PrxVI при лечении резаных ран, острых воспалительных процессов органов дыхания, вызванных бактериальными экзотоксинами и т.д. Таким образом, ферменты-антиоксиданты следует рассматривать как перспективные лекарственные препараты антиоксидантного действия для лечения патологий различного происхождения.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, программы Министерства образования и науки РФ “Поддержка ведущих научных школ” (НШ-1853.2012.4) и гранта РФФИ № 13-04-00576.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Eklund H., Cambillau C., Sjöberg B.M., Holmgren A., Jörnvall H., Höög J.O., Brändén C.I. 1984. Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO J.* **3**, 1443–1449.
- Arnér E.S., Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102–6109.
- Qi Y., Grishin N.V. 2005. Structural classification of thioredoxin-like fold proteins. *J. Proteins.* **58**, 376–388.
- Holmgren A., Soderberg B.O., Eklund H., Branden C.I. 1975. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.7 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 2305–2309.
- Katti S.K., LeMaster D.M., Eklund H. 1990. Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **212**, 167–184.
- Bushweller J.H., Billeter M., Holmgren A., Wuthrich K. 1994. The nuclear magnetic resonance solution structure of the mixed disulfide between *Escherichia coli* glutaredoxin (C14S) and glutathione. *J. Mol. Biol.* **235**, 1585–1597.
- Eklund H., Ingelman M., Söderberg B.O., Uhlin T., Nordlund P., Nikkola M., Sonnerstam U., Joelson T., Petratos K. 1992. Structure of oxidized bacteriophage T4 glutaredoxin (thioredoxin): refinement of native and mutant proteins. *J. Mol. Biol.* **228**, 596–618.
- Sodano P., Xia T.H., Bushweller J.H., Björnberg O., Holmgren A., Billeter M., Wüthrich K. 1991. Sequence specific H n.m.r. assignments and determination of the three-dimensional structure of reduced *Escherichia coli* glutaredoxin. *J. Mol. Biol.* **221**, 1311–1324.
- Xia T.H., Bushweller J.H., Sodano P., Billeter M., Björnberg O., Holmgren A., Wüthrich K. 1992. NMR structure of oxidized *Escherichia coli* glutaredoxin: comparison with reduced *E. coli* glutaredoxin and functionally related proteins. *J. Protein Sci.* **1**, 310–321.
- Ji X., Zhang P., Armstrong R.N., Gilliland G.L. 1992. The three-dimensional structure of a glutathione S-transferase from the p. gene class. Structural analysis of the binary complex of isozyme 3-3 and glutathione at 2.2 Å resolution. *J. Biochemistry.* **31**, 10169–10184.
- Reinemer P., Dirr H.W., Ladenstein R., Schäffer J., Gallay O., Huber R. 1991. The three-dimensional structure of class r glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. *J. EMBO.* **10**, 1997–2005.
- Reinemer P., Dirr H.W., Ladenstein R., Huber R., Lo Bello M., Federici G., Parker M.W. 1992. Three-dimensional structure of class r glutathione S-transferase from human placenta in complex with S-hexylglutathione at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **227**, 214–226.
- Sinning I., Jones T.A. 1993. Structure determination and refinement of human class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the pI and rr class enzymes. *J. Mol. Biol.* **232**, 192–212.
- Martin J.L., Bardwell J.C.A., Kuriyan J. 1993. Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation *in vivo*. *J. Nature.* **365**, 464–468.
- Fomenko D.E., Gladyshev V.N. 2003. CxxS: fold-independent redox motif revealed by genome-wide searches for thiol/disulfide oxidoreductase function. *J. Biochemistry.* **42**, 11214–11225.
- Jacob C., Giles G.I., Giles N.M., Sies H. 2003. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *J. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 4742–4758.
- Johansson L., Gafvelin G., Arnér E.S. 2005. Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. *J. Biochim. Biophys. Acta.* **1726**, 1–13.
- Mills G.C. 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* **229**, 189–197.
- Sunde R.A. 1997. Selenium. In: *Handbook of nutritionally essential mineral elements*. Eds O'Dell B.L., Sunde R.A. N.Y.: Marcel Dekker, 493–556.
- Grossmann A., Wendel A. 1983. Non-reactivity of the selenoenzyme glutathione peroxidase with enzymically hydroperoxidised phospholipids. *Eur. J. Biochem.* **135**, 549–552.
- Chu F.F., Doroshov J.H., Esworthy R.S. 1993. Expression, characterization and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J. Biol. Chem.* **268**, 2571–2576.
- Florian S., Winkler K., Schmehl K., Jacobasch G., Kreuzer O.J., Meyerhof W., Brigelius-Flohe R. 2001. Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radic. Res.* **35**, 655–663.
- Murawaki Y., Tsuchiya H., Kanbe T., Harada K., Yashima K., Nozaka K., Tanida O., Kohno M., Mukoyama T., Nishimuki E., Kojo H., Matsura T., Takahashi K., Osaki M., Ito H., Yodoi J., Murawaki Y., Shiota G. 2008. Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer. *Cancer Lett.* **259**, 218–230.
- Chu F.F., Esworthy R.S., Chu P.G., Longmate J.A., Huycke M.M., Wilczynski S., Doroshov J.H. 2004. Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted GPx1 and GPx2 genes. *Cancer Res.* **64**, 962–968.
- Esworthy R.S., Yang L., Frankel P.H., Chu F.F. 2005. Epithelium-specific glutathione peroxidase, GPx2, is

- involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice. *J. Nutr.* **135**, 740–745.
26. Burk R.F., Hill K.E. 2005. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.* **25**, 215–235.
 27. Yoshimura S., Watanabe K., Suemizu H., Onozawa T., Mizoguchi J., Tsuda K., Hatta H., Moriuchi T. 1991. Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *J. Biochem.* **109**, 918–923.
 28. Schmutzler C., Mentrup B., Schomburg L., Hoang-Vu C., Herzog V., Kohrle J. 2007. Selenoproteins of the thyroid gland: expression, localization and possible function of glutathione peroxidase 3. *Biol. Chem.* **388**, 1053–1059.
 29. Ottaviano F.G., Tang S.S., Handy D.E., Loscalzo J. 2009. Regulation of the extracellular antioxidant selenoprotein plasma glutathione peroxidase (GPx-3) in mammalian cells. *Mol. Cell. Biochem.* **327**, 111–126.
 30. Bjornstedt M., Xue J., Huang W., Akesson B., Holmgren A. 1994. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **269**, 29382–29384.
 31. Freedman J.E., Loscalzo J., Benoit S.E., Valeri C.R., Barnard M.R., Michelson A.D. 1996. Decreased platelet inhibition by nitric oxide in two brothers with a history of arterial thrombosis. *J. Clin. Invest.* **97**, 979–987.
 32. Ursini F., Heim S., Kiess M., Maiorino M., Roveri A., Wissing J., Flohe L. 1999. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*. **277**, 1393–1396.
 33. Roveri A., Casasco A., Maiorino M., Dalan P., Calligaro A., Ursini F. 1992. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J. Biol. Chem.* **267**, 6142–6146.
 34. Brigelius-Flohe R. 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases – analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 951–965.
 35. Pushpa Rekha T., Burdsal L.M., Chilsom G.M., Driscoll D.M. 1985. Rat phospholipid-hydroperoxidase glutathione peroxidase: cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *J. Biol. Chem.* **270**, 26993–26999.
 36. Pfeifer H., Conrad M., Roethlein D., Kyriakopoulos A., Brielmeier M., Bornkamm G.W., Behne D. 2001. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J.* **15**, 1236–1238.
 37. Conrad S., G. Moreno F., Sinowatz F., Ursini S., Kölle A., Roveri M., Brielmeier W., Wurst M., Maiorino and Bornkamm G.W. 2005. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol. Cell Biol.* **25**, 7637–7639.
 38. Maiorino M.J.B., Wissing R., Brigelius-Flohe F., Calabrese A., Roveri P., Steinert F., Ursini F., Flohe L. 1995. Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **376**, 651–660.
 39. Roveri A., Ursini F., Flohe L., Maiorino M. 2001. PHGPx and spermatogenesis. *Biofactors.* **14**, 213–222.
 40. Van Heusden G.P.H. 2005. 14-3-3 proteins: regulators of numerous eukaryotic proteins. *J. IUBMB Life.* **57**, 623–629.
 41. Maiorino M., Roveri A., Benazzi L., Bosello V., Mauri P., Toppo S., Tosatto S. C., Ursini F. 2005. Functional interaction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein discloses the adjacent cysteine motif as a new substrate of the selenoperoxidase. *J. Biol. Chem.* **280**, 38395–38402.
 42. Peltola V., Huhtaniemi I., Metsa-Ketela T., Ahotupa M. 1996. Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology.* **137**, 105–112.
 43. Ho Y.-S., Magnenat J.L., Bronson R.T., Cao J., Gargano M., Sugawara M., Funk C.D. 1997. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.* **272**, 16644–16651.
 44. Ghyselinck N.B., Dufaure J.P. 1990. A mouse cDNA sequence for epididymal androgen-regulated proteins related to glutathione peroxidases. *Nucl. Acids Res.* **18**, 7144.
 45. Jimenez C., Lefrancois A., Ghyselinck N.B., Dufaure J.P. 1992. Characterization and hormonal regulation of 24 kDa protein synthesis by the adult murine epididymis. *J. Endocrinol.* **133**, 197–203.
 46. Vernet P., Faure J., Dufaure J.P., Drevet J.R. 1997. Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Mol. Rep. Dev.* **47**, 87–98.
 47. Rejraji H., Vernet P., Drevet J.R. 2002. GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Mol. Rep. Dev.* **63**, 96–103.
 48. Thisse C., Degraeve A., Kryukov G.V., Gladyshev V.N., Obrecht-Pflumio S., Krol A., Thisse B., Lescure A. 2003. Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. *Gene Exp. Patterns.* **3**, 525–532.
 49. Varlamova E.G. 2011. Intracellular localization of mammalian selenoproteins: SelV (Selenoprotein V) and GPx6 (Glutathione peroxidase 6). *Fundamental. Res.* **9**, 326–330.
 50. Utomo A., Jiang X.Z., Furuta S., Yun J., Levin D.S., Wang Y.C.J., Desai K.V., Green J.E., Chen P.L.,

- Lee W.H. 2004. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 43522–43529.
51. Thomas J.P., Maiorino M., Ursini F., Girotti A.W. 1990. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid-peroxidation – *in situ* reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* **265**, 454–461.
52. Ursini F., Maiorino M., Gregolin C. 1985. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **839**, 62–70.
53. Nguyen V.D., Saaranen M.J., Karala A.R., Lappi A.K., Wang L., Raykhel I.B., Alanen H.I., Salo K.E., Wang C.C., Ruddock L.W. 2011. Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. *J. Mol. Biol.* **406**, 503–515.
54. Rocher C., Lalanne J.L., Chaudière J. 1992. Purification and properties of a recombinant sulfur analog of murine selenium-glutathione peroxidase. *Eur. J. Biochem.* **205**, 955–960.
55. Maiorino M., Aumann K.D., Brigelius-Flohé R., Doria D., van den Heuvel J., McCarthy J., Roveri A., Ursini F., Flohé L. 1995. Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol. Chem.* **376**, 651–660.
56. Flohe L., Gunzler W.A., Schock H.H. 1973. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* **32**, 132–134.
57. Flohe L., Loschen G., Gunzler W.A., Eichele E. 1972. Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. *Physiol. Chem* **353**, 987–999.
58. Kraus R.J., Prohaska J.R., Ganther H.E. 1980. Oxidized forms of ovine erythrocyte glutathione peroxidase. Cyanide inhibition of a 4-glutathione: 4-selenoenzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **615**, 19–26.
59. Takebe G., Yarimizu J., Saito Y., Hayashi T., Nakamura H., Yodoi J., Nagasawa S., and Takahashi K. 2002. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* **277**, 41254–41258.
60. Ursini F., Maiorino M., Brigelius-Flohe R., Aumann K.D., Roveri A., Schomburg D., Flohe L. 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* **252**, 38–53.
61. Martinez J.I., Garcia R.D., Galarza A.M. 1982. The kinetic mechanism of glutathione peroxidase from human platelets. *Thromb. Res* **27**, 197–203.
62. Herbertte S., Roedel-Drevet P., Drevet J.R. 2007. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J.* **274**(9), 2163–80.
63. Lubos E., Loscalzo J., Handy D.E. 2011. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 1957–1998.
64. Lillig C.H., Berndt C., Holmgren A. 2008. Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta.* **1980**, 1304–1317.
65. Mieryl J.J., Gallogly M.M., Qanungo S., Sabens E.A., Shelton M.D. 2008. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1941–1988.
66. Wang J., Boja E.S., Tan W., Tekle E., Fales H.M., English S., Mieryl J.J., Chock P.B. 2001. Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 47763–47766.
67. Chen Y.R., Chen C.L., Pfeiffer D.R., Zweier J.L. 2007. Mitochondrial complex II in the post-ischemic heart: oxidative injury and the role of protein S-glutathionylation. *J. Biol. Chem.* **282**, 32640–32654.
68. Chen F.C., Ogut O. 2006. Decline of contractility during ischemia reperfusion injury: actin glutathionylation and its effect on allosteric interaction with tropomyosin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **290**, C719–C727.
69. Eaton P., Wright N., Harse D.J., Shattock M.J. 2002. Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase oxidation during cardiac ischemia and reperfusion. *J. Mol. Cell Cardiol.* **34**, 1549–1560.
70. Hurd T.R., Requejo R., Filipovska A., Brown S., Prime T.A., Robinson A.J., Fearnley I.M., 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. *J. Biol. Chem.* **283**, 24801–24815.
71. Holmgren A. 1976. Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**, 2275–2279.
72. Vlamis-Gardikas A., Holmgren A. 2002. Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. *Methods Enzymol.* **347**, 286–296.
73. Xia B., Vlamis-Gardikas A., Holmgren A., Wright P.E., Dyson H.J. 2001. Solution structure of *Escherichia coli* glutaredoxin-2 shows similarity to mammalian glutathione-S-transferases. *J. Mol. Biol.* **310**, 907–918.
74. Rodriguez-Manzanique M.T., Ros J., Cabisco E., Sorribas A., Herrero E. 1999. Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **19**, 8180–8190.
75. Witte S., Villalba M., Bi K., Liu Y., Isakov N., Altman A. 2000. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF-kappaB pathways by PICOT, a novel protein kinase. *E. coli* glutaredoxins 73 C-inter-

- acting protein with a thioredoxin homology domain. *J. Biol. Chem.* **275**, 1902–1909.
76. Takashima Y., Hirota K., Nakamura H., Nakamura T., Akiyama K., Cheng F.S., Maeda M., Yodoi J. 1999. Differential expression of glutaredoxin and thioredoxin during monocytic differentiation. *Immunol. Lett.* **68**, 397–401.
 77. Bandyopadhyay S., Starke D.W., Mielal J.J., Gronostajski R.M. 1998. Thioltransferase (glutaredoxin) reactivates the DNA-binding activity of oxidation-inactivated nuclear factor I. *J. Biol. Chem.* **273**, 392–397.
 78. Hirota K., Matsui M., Murata M., Takashima Y., Cheng F.S., Itoh T., Fukuda K., Yodoi J. 2000. Nucleoredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin differentially regulate NF-kappaB, AP-1, and CREB activation in HEK293 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 177–182.
 79. Beer S.M., Taylor E.R., Brown S.E., Dahm C.C., Costa N.J., Runswick M.J., 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. *J. Biol. Chem.* **279**, 47939–47951.
 80. Lillig C.H., Lonn M.E., Enoksson M., Fernandes A.P., Holmgren A. 2004. Short interfering RNA-mediated silencing of glutaredoxin 2 increases the sensitivity of HeLa cells toward doxorubicin and phenylarsine oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 13227–13232.
 81. Enoksson M., Fernandes A.P., Prast S., Lillig C.H., Holmgren A., Orrenius S. 2005. Overexpression of glutaredoxin 2 attenuates apoptosis by preventing cytochrome c release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 774–779.
 82. Rodriguez-Manzaneque M.T., Tamarit J., Belli G., Ros J., Herrero E. 2002. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 1109–1121.
 83. Wood Z.A., Schröder E., Harris J.R., Poole L.B. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 32–40.
 84. Soito L., Williamson C, Knutson S.T., Fetrow J.S., Poole L.B. and Nelson K.J. 2011. PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucl. Acids Res.* **39**, D332–D337.
 85. Nelson K.J., Knutson S.T., Soito L., Klomsiri C., Poole L.B., Fetrow J.S. 2010. Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins.* **79**, 947–964.
 86. Jeong W., Cha M.K., Kim I.H. 2000. Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol – specific antioxidant protein (TSA)/alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family. *J. Biol. Chem.* **275**, 2924–2930.
 87. Hofmann B., Hecht H.H., Flohe L. 2002. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* **383**, 347–364.
 88. Copley S.D., Novak W.R., Babbitt P.C. 2004. Divergence of function in the thioredoxin fold superfamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry.* **43**, 13981–13995.
 89. Claiborne A., Yeh J.I., Mallett T.C., Luba J., Crane E.J., Charrier V., Parsonage D. 1999. Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochemistry.* **38**, 15407–15416.
 90. Wood Z.A., Poole L.B., Karplus P.A. 2003. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science.* **300**, 650–653.
 91. Seo M.S., Kang S.W., Kim K., Baines I.C., Lee T.H., Rhee S.G. 2000. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J. Biol. Chem.* **275**, 20346–20354.
 92. Poole L.B., Reynolds C.M., Wood Z.A., Karplus P.A., Ellis H.R., Li Calzi M. 2000. AhpF and other NADH: peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6126–6133.
 93. Choi H.J., Kang S.W., Yang C.H., Rhee S.G., Ryu S.E. 1998. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 400–406.
 94. Ishii T., Yamada M., Sato H., Matsue M., Taketani S., Nakayama K., Sugita Y., Bannai S. 1993. Cloning and characterization of a 23-kDa stress-induced mouse peritoneal macrophage protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 18633–18636.
 95. Wonsey D.R., Zeller K.I., Dang C.V. 2002. The c-Myc target gene PRDX3 is required for mitochondrial homeostasis and neoplastic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 6649–6654.
 96. Prospero M.T., Ferbus D., Rouillard D., Goubin G. 1998. The pag gene product, a physiological inhibitor of c-abl tyrosine kinase, is overexpressed in cells entering S phase and by contact with agents inducing oxidative stress. *FEBS Lett.* **423**, 39–44.
 97. Wang X., Phelan S.A., Forsman-Semb K., Taylor E.F., Petros C., Brown A., Lerner C.P., Paigen B. 2003. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **278**, 25179–25190.
 98. Kim H.S., Manevich Y., Feinstein S.I., Pak J.H., Ho Y.S., Fisher A.B. 2003. Induction of l-cys peroxiredoxin expression by oxidative stress in lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **285**, 363–369.
 99. Jin D.Y., Chae H.Z., Rhee S.G., Jeang K.T. 1997. Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 30952–30961.

100. Chang J.W., Jeon H.B., Lee J.H., Yoo J.S., Chun J.S., Kim J.H., Yoo Y.J. 2001. Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 507–512.
101. Kim H.S., Kang S.W., Rhee S.G., Clerch L.B. 2001. Rat lung peroxiredoxins I and II are differentially regulated during development and by hyperoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Physiol.* **280**, 1212–1217.
102. Yanagawa T., Ishikawa T., Ishii T., Tabuchi K., Iwasa S., Bannai S., Omura K., Suzuki H., Yoshida H. 1999. Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors. *Cancer Lett.* **145**, 127–132.
103. Yanagawa T., Iwasa S., Ishii T., Tabuchi K., Yusa H., Onizawa K., Omura K., Harada H., Suzuki H., Yoshida H. 2000. Peroxiredoxin I expression in oral cancer: a potential new tumor marker. *Cancer Lett.* **156**, 27–35.
104. Noh D.Y., Ahn S.J., Lee R.A., Kim S.W., Park I.A., Chae H.Z. 2001. Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. *Anticancer Res.* **21**, 2085–2090.
105. Karihtala P., Mäntyniemi A., Kang S.W., Kinnula V.L., Soini Y. 2003. Peroxiredoxins in breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **9**, 3418–3424.
106. Immenschuh S., Baumgart-Vogt E., Tan M., Iwahara S., Ramadori G., Fahimi H.D. 2003. Differential cellular and subcellular localization of heme-binding protein 23/peroxiredoxin I and heme oxygenase-1 in rat liver. *J. Histochem. Cytochem.* **51**, 1621–1631.
107. Neumann C.A., Krause D.S., Carman C.V., Das S., Dubey D.P., Abraham J.L., Bronson R.T., Fujiwara Y., Orkin S.H., van Etten R.A. 2003. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature.* **424**, 561–565.
108. Knoop B., Clippe A., Bogard C., Arsalane K., Wattiez R., Hermans C., Duconseille E., Falmagne P., Bernard A. 1999. Cloning and characterization of AOEB166, a novel mammalian antioxidant enzyme of the peroxiredoxin family. *J. Biol. Chem.* **274**, 30451–30458.
109. Peshenko I.V., Novoselov V.I., Evdokimov V.A., Nikolaev Yu.V., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Fesenko E.E. 1996. Novel 28-kDa secretory protein from rat olfactory epithelium. *FEBS Lett.* **381**, 12–14.
110. Peshenko I.V., Novoselov V.I., Evdokimov V.A., Nikolaev Y.V., Kamzalov S.S., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Fesenko E.E. 1998. Identification of a 28 kDa secretory protein from rat olfactory epithelium as a thiol-specific antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 654–659.
111. Novoselov V.I., Peshenko I.V., Evdokimov V.A., Kamzalov S.S., Novoselov S.V., Nikolaev Iu.V., Bystrova M.F., Fesenko E.E. 1998. Properties of the catalytic center of a secretory 28 kDa protein (1-cys peroxiredoxin) from rat olfactory epithelium. *Biofizika.* **43**, 610–616.
112. Peshenko I.V., Shichi H. 2001. Oxidation of active center cysteine of bovine 1-cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxytrite. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 292–303.
113. Chen J.W., Dodia C., Feinstein S.I., Jain M.K., Fisher A.B. 2000. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J. Biol. Chem.* **275**, 28421–28427.
114. Novoselov V.I., Baryshnikova L.M., Yanin V.A., Amelina S.E., Fesenko E.E. 2003. The influence of peroxyredoxin VI on incised-wound healing in rats. *Dokl. Biochem. Biophys.* **393**, 326–327.
115. Muller F.L., Lustgarten M.S., Jang Y., Richardson A., Van Remmen H. 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 477–503.
116. Holmgren A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**, 13963–13966.
117. Brandes H.K., Larimer F.W., Geck M.K., Stringer C.D., Schurmann P., Hartman F.C. 1993. Direct identification of the primary nucleophile of thioredoxin f. *J. Biol. Chem.* **268**, 18411–18414.
118. Laurent T.C., Moore E.C., Reichard P. 1964. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli*. *B. J. Biol. Chem.* **239**, 3436–3444.
119. Krone F.A., Westphal G., Meyer H.E., Schwenn J.D. 1990. PAPS-reductase of *Escherichia coli*. Correlating the N-terminal amino acid sequence with the DNA of gene *cys H*. *FEBS Lett.* **260**, 6–9.
120. Shi J., Vlamis-Gardikas A., Aslund F., Holmgren A., Rosen B.P. 1999. Reactivity of glutaredoxins 1, 2, and 3 from *Escherichia coli* shows that glutaredoxin 2 is the primary hydrogen donor to ArsC-catalyzed arsenate reduction. *J. Biol. Chem.* **274**, 36039–36042.
121. Meyer Y., Vignols F. and Reichheld J. P. 2002. Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol.* **347**, 394–402.
122. Lemaire S. D., Collin V., Keryer E., Quesada A., Miginiac-Maslow M. 2003. Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* **543**, 87–92.
123. Sahrawy M., Hecht V., Lopez-Jaramillo J., Chueca A., Chartier Y., Meyer Y. 1996. Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains. *J. Mol. Evol.* **42**, 422–431.
124. Laloi C., Rayapuram N., Chartier Y., Grienenberger J.M., Bonnard G., Meyer Y. 2001. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 14144–14149.
125. Gasdaska P.Y., Gasdaska J.R., Cochran S., Powis G. 1995. Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase. *FEBS Lett.* **373**, 5–9.
126. Gasdaska P.Y., Berggren M.M., Berry M.J., Powis G. 1999. Cloning, sequencing and functional expression

- of a novel human thioredoxin reductase. *FEBS Lett.* **442**, 105–111.
127. Jimenez A., Johansson C., Ljung J. et al. 2002. Human spermatid-specific thioredoxin-1 (Sptrx-1) is a two-domain protein with oxidizing activity. *FEBS Lett.* **530**, 79–84.
128. Sadek C.M., Damdimopoulos A.E., Pelto-Huikko M., Gustafsson J.A., Spyrou G., Miranda-Vizuete A. 2001. Sptrx-2, a fusion protein composed of one thioredoxin and three tandemly repeated NDP-kinase domains is expressed in human testis germ cells. *Genes Cells.* **6**, 1077–1090.
129. Jeong W., Yoon H.W., Lee S., Rhee S.G. 2004. Identification and characterization of TRP14, a thioredoxin-related protein of 14 kDa. New insights into the specificity of thioredoxin function. *J. Biol. Chem.* **279**, 3142–3150.
130. Witte S., Villalba M., Bi K., Liu Y., Isakov N., Altman A. 2000. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF-kappaB pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. *J. Biol. Chem.* **275**, 1902–1909.
131. Matsui M., Oshima M., Oshima H., Takaku K., Maruyama T. 1996. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev. Biol.* **178**, 179–185.
132. Bondareva A.A., Capecchi M.R., Iverson S.V., Li Y., Lopez N.I. 2007. Effects of thioredoxin reductase-1 deletion on embryogenesis and transcriptome. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 911–923.
133. Nonn L., Williams R.R., Erickson R.P., Powis G. 2003. The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 916–922.
134. Conrad M., Jakupoglu C., Moreno S.G., et al. 2004. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 9414–9423.