

UKŁAD TIOREDOKSYNA-REDUKTAZA TIOREDOKSYNY JAKO NOWY CEL TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWYCH

THIOREDOXIN-THIOREDOXIN REDUCTASE SYSTEM – A NOVEL TARGET FOR ANTITUMOR THERAPY

Angelika SZOKALSKA

Zakład Immunologii Centrum Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: Wiele szlaków biochemicznych, istotnych w takich procesach, jak: ochrona komórki przed stresem oksydacyjnym, proliferacja, czy też metabolizm selenu, przebiega z udziałem układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny. Układ ten tworzą białka o charakterze enzymatycznym: tioredoksyna oraz reduktaza tioredoksyny, a do jego działania niezbędne są cząsteczki NADPH, pozyskiwane głównie w cyklu pentozofosforanowym. Ze względu na istotne znaczenie kontrolowanych drogą reakcji redoks procesów, białka z rodziny tioredoksyny występują u niemal wszystkich organizmów, a elementy wiążące tioredoksynę kodowane są nawet przez genomy niektórych wirusów. Okazuje się także, że w zależności od stanu utlenienia oraz rodzaju alternatywnego cięcia i składania pierwotnego transkryptu, białka opisywanego układu mogą pełnić różne funkcje poza komórką, np. w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Obecnie pojawia się coraz więcej prac potwierdzających nie tylko istotną rolę układu tioredoksyny w kancerogenezie, ale także w powstawaniu oporności komórek nowotworowych na standardowe metody leczenia nowotworów.

Słowa kluczowe: reduktaza tioredoksyny, tioredoksyna, nowotwór.

Summary: A bulk of biochemical pathways, which play a crucial role in such processes as protection of cells from oxidative stress, cellular proliferation or selenium metabolism are regulated by thioredoxin - thioredoxin reductase system. This system consists of two groups of enzymatic proteins which require NADPH for their activity. NADPH is acquired mainly from pentose phosphate pathway. Proteins from thioredoxin family can be found in all organisms. Moreover, a number of viral products exploit thioredoxin - thioredoxin reductase system for their replication. It has been shown, that various splicing forms of thioredoxin may exert unique physiological functions, for instance in the regulation of the immune response. Recently, a growing number of reports revealed that this system participates in several stages of carcinogenesis and can affect the outcome of standard antitumor treatments.

Keywords: thioredoxin reductase, thioredoxin, tumor.

Wykaz skrótów: **ADF** (ang. *adult T cell leukemia-derived factor*) – czynnik pochodzący z limfocytów T białaczki dorosłych; **AP-1** (ang. *activating protein 1*) – białko aktywujące; **ASK-1** (ang. *apoptosis regulating kinase 1*) – kinaza regulująca apoptozę; **FAD** (ang. *flavin adenine dinucleotide*) – dinukleotyd flawinoadenylanowy; **HIF-1 α** (ang. *hypoxia inducible factor 1 alpha*) – czynnik indukowany przez

niedotlenienie; **hTERT** (ang. *human telomerase reverse transcriptase*) – ludzka odwrotna transkryptaza telomerowa; **HTLV-I** (ang. *human T cell leukemia virus type-I*) – typ I ludzkiego wirusa białaczki wywodzącej się z limfocytów T; **IL-2** – interleukina 2; **NADPH** (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*) – dinukleotyd nikotynoamidoadenylanowy; **NFκB** (ang. *nuclear factor κB*) – czynnik jądrowy κB; **RNAi** – interferencja RNA; **SECIS** (ang. *selenocysteine insertion sequence*) – sekwencja kierująca wbudowywaniem selenocysteiny do powstających białek; **SeCys** – selenocysteina; **Trx1** – tioredoksyna I (cytoplazmatyczna); **Trx2** – tioredoksyna II (mitochondrialna); **TrxR1** – reduktaza tioredoksyny I (cytoplazmatyczna); **TrxR2** – reduktaza tioredoksyny II (mitochondrialna); **TrxR3** – glutationowa reduktaza tioredoksyny; **TNF** (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworów; **UTR** (ang. *untranslated region*) – region mRNA niepodlegający translacji; **VEGF** (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu komórek śródbłónka.

1. WSTĘP

Rozrost nowotworowy spowodowany jest niepohamowaną proliferacją komórek oraz upośledzeniem fizjologicznych mechanizmów śmierci komórki. Przyczyny tych zjawisk nie zostały dotychczas w pełni wyjaśnione. Podczas poszukiwań mechanizmów związanych z nowotworzeniem wciąż odkrywano nowe czynniki transkrypcyjne, enzymy oraz inne cząsteczki, których zmiana aktywności czy też w regulacji ich syntezy w komórce wpływają w sposób istotny na powstawanie nowotworu. Wydaje się, że do takich białek należą także enzymy tworzące układ tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny. Aktualnie prowadzone są intensywne poszukiwania inhibitorów mogących regulować aktywność wspomnianego układu w komórkach nowotworowych. Obniżenie aktywności układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny może stanowić ważny element nowoczesnych, celowanych terapii przeciwnowotworowych.

2. TIOREDOKSYNA

Tioredoksyne (Trx) została opisana po raz pierwszy w 1964 roku jako białko utrzymujące w zredukowanej formie reduktazę rybonukleotydów u bakterii *Escherichia coli* [20]. Ludzka tioredoksyna została początkowo sklonowana jako cytokinopodobny czynnik ADF (*adult T cell leukemia-derived factor*), wpływający na wzrost syntezy łańcucha receptora dla IL-2. Czynnik ten wyizolowano z supernatantu hodowli limfocytów T transformowanych wirusem HTLV-I (*human T cell leukemia virus type-I*) [43,52]. Tiorredoksyny to małe białka o masie 12 kDa, zbudowane ze 105 aminokwasów. Jednak u człowieka ponad 99% tioredoksyn zostaje pozbawione N-końcowej metioniny, a łańcuch białkowy rozpoczyna się waliną. Białko takie składa się wówczas ze 104 aminokwasów. Miejscem aktywnym w cząsteczce białka jest rejon zawierający sekwencję -Cys-Gly-Pro-Cys- wiernie zachowany ewolucyjnie i identyczny zarówno u *E. coli*, jak i u człowieka. Tiorredoksyna pełni swoją funkcję kontrolując stan redoks komórki dzięki grupom sulfhydrylowym, odnawianym przez reduktazę tioredoksyny. W komórkach występuje

w dwóch formach: cytoplazmatycznej (Trx1) oraz mitochondrialnej (Trx2). Gen kodujący Trx1 znajduje się na chromosomie 9 i składa się z pięciu egzonów, przedzielonych czterema intronami. Natomiast Trx2 kodowana jest na chromosomie 22, a w swojej budowie zawiera sekwencję odpowiedzialną za transport białka do mitochondriów. Zarówno Trx1, jak i Trx2 występują w postaci monomerów.

3. REDUKTAZA TIOREDOKSYNY

Reduktaza tioredoksyiny jest selenoproteiną, która w komórkach ssaków występuje jako homodimer w formie trzech izoenzymów: cytoplazmatycznej (TrxR1), mitochondrialnej (TrxR2) oraz jako glutationowa reduktaza tioredoksyiny (TrxR3). Najlepiej poznana została forma cytoplazmatyczna. Miejsce katalityczne w cząsteczce białka jest zachowany ewolucyjnie rejon zawierający sekwencję -Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys-, charakterystyczny również dla reduktazy glutationowej. W każdym monomerze TrxR występuje miejsce z wbudowaną cząsteczką FAD. Podczas reakcji redoks elektrony są transportowane z NADPH poprzez FAD do miejsca aktywnego, gdzie redukowany jest substrat [10]. Kodon selenocysteiny (SeCys) jest jednocześnie kodonem terminalnym UGA i jego odczytanie podczas translacji jako kodonu dla SeCys wymaga specyficznego fragmentu mRNA – 3'UTR (*untranslated region*) – zwanego selenocysteinową sekwencją insercyjną SECIS (*selenocysteine insertion sequence*) [1, 23]. Sekwencja SECIS u *Eukariota* znajduje się tuż poniżej kodonu UGA i formuje pętlę, która hamuje ruch podjednostek rybosomów, opóźniając translację i w ten sposób zwiększa wydajność włączania SeCys w strukturę powstającego białka. W proces ten są także zaangażowane białka – tzw. czynniki elongacji, których zadaniem jest rozpoznanie struktury SECIS i pozyskanie tRNA transportującego SeCys [26].

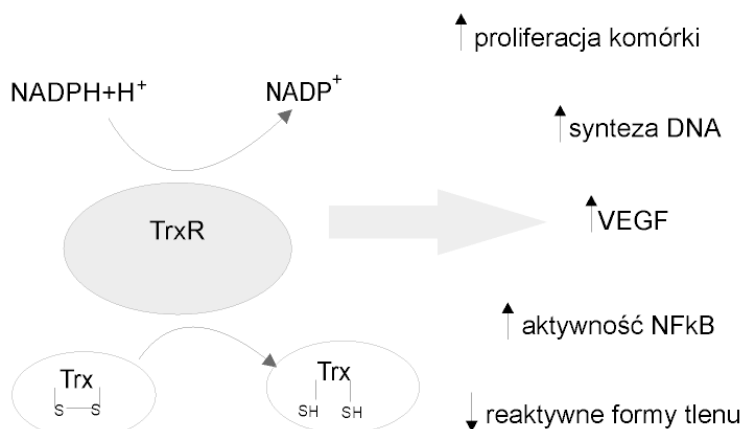
Gen reduktazy tioredoksyiny 1 znajduje się na chromosomie 12q23-q24.1. W procesie transkrypcji możliwe jest powstanie pięciu alternatywnych transkryptów. Transkrypt pierwszy koduje najdłuższą izoformę reduktazy tioredoksyiny 1, natomiast transkrypty: drugi, trzeci i czwarty kodują tę samą izoformę białka ze skróconą w stosunku do poprzedniej sekwencją na N końcu. Reduktaza tioredoksyiny 2, w porównaniu z TrxR1, ma dodatkowe 33 aminokwasy, na końcu N cząsteczki, odpowiedzialne za transport enzymu do mitochondriów [6,34]. Dotychczas najsłabiej zbadana jest glutationowa reduktaza tioredoksyiny, kodowana przez ostatni – piąty, z możliwych transkryptów genu reduktazy tioredoksyiny 1. Początkowo wydawało się, że jest ona specyficzna dla narządów płciowych: jąder i jajników, ale jej ekspresję wykazano także w śledzionie, nerce, sercu oraz w wątrobie [34]. Ostatnie doniesienia wskazują na rolę TrxR3 w polimeryzacji aktyny i tubuliny oraz na jej wpływ na kształt błony komórkowej [7]. TrxR3 została wykryta w komórkach ludzkich, psich, szympanich, nie odnaleziono jednak aktywnej formy TrxR3 w organizmach szczura i myszy [42].

4. FUNKCJE BIOLOGICZNE UKŁADU TIOREDOKSYNA - REDUKTAZA TIOREDOKSYNY

Niewątpliwie, jedną z ważniejszych ról, jakie odgrywa układ tioredoksy, jest jego wpływ na wzrost i proliferację komórki [54]. Wpływ ten jest jednak widoczny tylko wówczas, gdy układ sprawnie przechodzi z formy utlenionej do zredukowanej. Mutanty pozbawione możliwości odnawiania zredukowanej formy tioredoksy, nie wykazują aktywnego działania tych białek zarówno w procesie wzrostu komórkowego, jak i hamowaniu apoptozy [10]. Jednakże transfekcja linii komórkowej raka piersi MCF-7 wektorem, zawierającym gen dla Trx1, trzykrotnie zwiększa aktywność tego enzymu przy jedynie 50% stymulacji wzrostu komórkowego. Obserwowane zjawisko może być spowodowane niedostatkami selenu w pożywkach stosowanych do hodowli komórkowych, gdyż pierwiastek ten wykazuje istotny wpływ na wytwarzanie określonych form Trx, a tym samym jego dostępność decyduje o zadaniach, jakie enzym spełnia w komórkach [15]. Znacznie łatwiej jest natomiast wywołać efekt odwrotny, tzn. zahamowanie układu tioredoksy powoduje jednocześnie bardzo wyraźne komórkowe działanie cytostatyczne. Jeden ze znanych inhibitorów reduktazy tioredoksy – doksorubicyna powoduje w następstwie swojego działania, zmniejszenie aktywności reduktazy rybonukleotydów i jednocześnie zatrzymanie cyklu komórkowego, uniemożliwiając komórce dalsze podziały. Należy podkreślić, że wpływ opisywanego układu na proliferację tłumaczy się przede wszystkim utrzymywaniem przez reduktazę tioredoksy aktywnej, zredukowanej formy reduktazy rybonukleotydowej, wytwarzającej w organizmie dezoksyrybonukleotydy, niezbędne do budowy DNA.

Najbardziej znaną rolą układu tioredoksy jest ochrona przed stresem oksydacyjnym. W komórkach poddanych działaniu reaktywnych form tlenu reduktaza tioredoksy zabezpiecza je przed apoptozą. Udowodniono wzrost mRNA Trx1 oraz Trx2 w płucach noworodków pawianów, które zaraz po urodzeniu, oddychając powietrzem atmosferycznym poddane są działaniu tlenu cząsteczkowego [8]. Uważa się także, że zwiększona ekspresja opisywanych enzymów występuje w keratynocytach oraz melanocytach, gdzie prawdopodobnie ich główną funkcją jest ochrona komórki przed reaktywnymi formami tlenu powstającymi podczas działania promieni UV na skórę [38]. Wykryto także zwiększoną ilość Trx1 w komórkach odpowiadających za powstawanie zmian miażdżycowych [11].

Tioredoksyna 1 może być wydzielana do przestrzeni międzykomórkowej, w postaci pełnego białka lub też w formie skróconej, tzw. Trx80, które zaangażowane są w regulacji odpowiedzi immunologicznej [3,29]. Trx1 może także brać udział w regulacji ekspresji wielu genów poprzez czynnik transkrypcyjny NFκB [14]. Wykazano także, że zwiększone wytwarzanie reduktazy tioredoksy 1 uzyskane w wyniku działania TNF (ang. *tumor necrosis factor*; czynnik martwicy nowotworów) w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych doprowadza do zwiększenia aktywności czynnika NFκB i ekspresji regulowanych przez niego genów [36]. Aktywność reduktazy tioredoksy ma również wpływ na funkcję czynnika



RYCINA 1. Fizjologiczne funkcje układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny

transkrypcyjnego AP-1 (ang. *activating protein*) [40]. Układ tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny, regulując aktywność czynników transkrypcyjnych, wykazuje więc istotną rolę w stymulacji oraz hamowaniu ekspresji kolejnych genów, ważnych dla prawidłowego przebiegu procesów komórkowych.

Pojawiają się także doniesienia dotyczące wpływu układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny na zdolność łączenia się białka p53 z DNA [4,46]. Wyniki badań wskazują, że hamowanie układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny z użyciem RNAi zwiększa aktywność p53 i potęguje wydajność jego wiązania z kwasem dezoksyrybonukleinowym [39], co z kolei zmniejsza prawdopodobieństwo transformacji nowotworowej.

Należy także podkreślić, że organizmy, u których geny układu tioredoksyny zostały wyłączone technikami *knock-out*, giną w czasie wczesnej embriogenezy [16,5]. Przyczyną tego jest nie tylko rola reduktazy tioredoksyny w regulacji embriogenezy, ale także w odnawianiu enzymatycznie aktywnej formy wielu białek różnych szlaków komórkowych [31].

5. ROLA UKŁADU TIOREDOKSYNY W KANCEROGENEZIE

Trudno jest określić dokładnie, w jaki sposób układ tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny wpływa na nowotworzenie. Ze względu na różnorodne funkcje tego układu najbardziej prawdopodobne wydaje się, że istnieje nie jeden, a przynajmniej kilka różnych szlaków biochemicznych, w których może on sprzyjać rozwojowi nowotworów. Sam fakt, iż reduktaza tioredoksyny pełni istotną rolę w procesach wzrostu i proliferacji komórki, a także ma znaczenie w hamowaniu apoptozy nie pozostawia wątpliwości, że nieprzypadkowo jest ona wytwarzana w zwiększonych ilościach w wielu liniach komórek nowotworowych.

5.1. Wpływ układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny na wzrost nowotworów i proliferację komórek nowotworowych

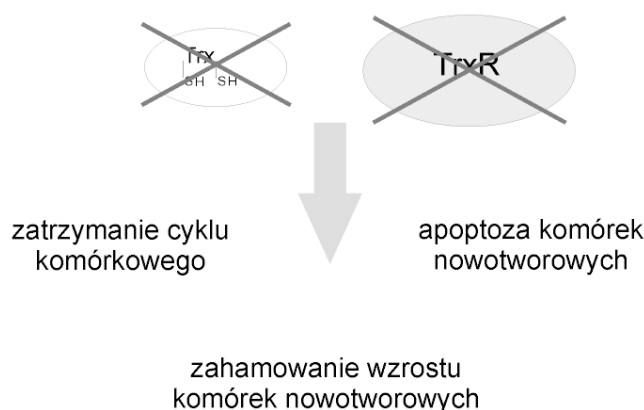
Wydaje się, że tioredoksyna, a także reduktaza tioredoksyny mogą sprzyjać podziałom komórki, oddziałując na ten proces zarówno z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, jak i aktywnie pełniąc swoje funkcje w cytoplazmie. Jak już wspomniano, Trx wydzielana na zewnątrz komórki może pełnić rolę regulującą aktywność układu odpornościowego, bezpośrednio oddziałując na leukocyty. Zaobserwowano również, że Trx oraz jej forma Trx80 mogą wpływać także na komórki nowotworowe, uruchamiając odpowiednie szlaki przekazywania sygnałów lub bezpośrednio na białka odpowiedzialne za uruchomienie syntezy DNA i tym samym doprowadzając do podziału komórki.

Istnieją także doniesienia, w których zaobserwowano, że obniżenie syntezy reduktazy tioredoksyny poprzez użycie antysensownego RNA doprowadza do jednoczesnego spadku ilości mRNA dla odwrotnej transkryptazy hTERT (ang. *human telomerase reverse transcriptase*), odpowiedzialnej za odbudowę telomerów, co między innymi powoduje zatrzymanie komórek w fazie G2/M cyklu i uniemożliwia im dalsze podziały [12].

Zwiększone wytwarzanie tioredoksyny oraz reduktazy tioredoksyny wykazano w komórkach nowotworowych charakteryzujących się wysoką agresywnością i dużym potencjałem tworzenia przerzutów. Były to między innymi: ludzki rak piersi oraz czerniak złośliwy [22].

5.2. Wpływ układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny na apoptozę komórek nowotworowych

Zaobserwowano istnienie korelacji pomiędzy wytwarzaniem reduktazy tioredoksyny a opornością komórek nowotworowych na śmierć w wyniku aktywacji szlaków prowadzących do apoptozy [53]. Tioredoksyna chroniąc komórki przed stresem oksydacyjnym, powoduje rozwinięcie się oporności nowotworu na terapie, których



RYCINA 2. Wpływ zahamowania aktywności układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny na komórki nowotworowe

reaktywne formy tlenu stanowią jeden z mechanizmów cytotoksyczności. Co więcej, okazuje się, że zredukowana forma Trx może łączyć się z kinazą ASK-1, spełniającą ważną rolę w procesie regulacji apoptozy, hamując w ten sposób jej funkcję [45]. Prawdopodobnie komórki nowotworowe zwiększają ekspresję białek układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny by uniknąć śmierci w drodze apoptozy.

5.3. Wpływ układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny na angiogenezę

Wzrost nowotworu nierozłącznie wiąże się z rozwojem sieci naczyń krwionośnych, umożliwiających komórkom transport tlenu i substancji odżywczych do powiększającej się masy komórek oraz usuwanie produktów ich metabolizmu. Pod wpływem niedotlenienia w komórkach nasila się ekspresja czynnika indukowanego przez niedotlenienie HIF-1 (ang. *hypoxia inducible factor 1*), który z kolei zwiększa między innymi wytwarzanie białka VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) inicjującego powstawanie naczyń krwionośnych [35]. Nieznany jest dokładny wpływ układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny na opisywany proces, jednakże pewne obserwacje wskazują, że wzrost wytwarzania Trx1 koreluje często z aktywnością czynnika transkrypcyjnego HIF-1 oraz wydzielaniem VEGF przez komórki nowotworowe [48,41]. Ilość Trx1, jak sugerują autorzy pracy, może stać się istotnym czynnikiem w prognozowaniu przebiegu choroby nowotworowej [44].

TABELA 1. Inhibitory reduktazy tioredoksyny

TrxR	Opis
Związki kompleksowe złota np. auranofina	Hamowanie aktywności TrxR, związek cytotoksyczny także dla komórek opornych na działanie cisplatyny [24]
Cyklofosfamid	Standardowo stosowany chemioterapeutyk, zaburzający proces syntezy DNA [47]
Palmarumycyna i jej rozpuszczalne w wodzie analogi, np. CP1	Hamowanie aktywności TrxR, metabolit pochodzący z grzybów [30]
Nitrozomocznik	Nieodwracalny inhibitor także dla reduktazy glutationowej [37]
Związki kompleksowe platyny Pt(II), Pt(IV)	Cis-diamminedichloroplatinum znajduje się w fazie badań klinicznych. Ich mechanizm działania polega na zahamowaniu procesu syntezy DNA [51]
Motexafin gadolinium	Związek znajduje się w III fazie badań klinicznych. Powoduje śmierć komórek nowotworowych w drodze apoptozy w wyniku zaburzenia stanu redoks komórki [55]
Kurkumina	Hamuje aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB, ma udowodnione działanie przeciwnowotworowe [9]
Doksorubicyna, diaziquone	Lek cytostatyczny używany w onkologii, tworzący stałe kompleksy z cząsteczkami DNA, uniemożliwiający podział komórek [25]

5.4. Wpływ układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny na tworzenie przerzutów

Nie jest jasne, czy podwyższona aktywność układu tioredoksyny w komórkach nowotworowych jest konieczna do tworzenia przerzutów. Jednakże sama tioredoksyna może redukować grupy siarkowe białek zewnątrzkomórkowych, takich jak laminina oraz oddziaływać na aktywność metaloproteinaz i tym samym mieć wpływ na zdolność do tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe.

6. PRÓBY STOSOWANIA INHIBITORÓW UKŁADU TIOREDOKSYNY JAKO LEKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Mechanizmem działania wielu współcześnie wytwarzanych leków przeciwnowotworowych jest hamowanie specyficznych cząsteczek (głównie enzymów), których aktywność jest niezbędna dla przeżycia komórki nowotworowej. Zahamowanie działania układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny powoduje obniżenie zdolności proliferacyjnych komórek, co sprawia, że stają się one bardziej wrażliwe na reaktywne formy tlenu, a prawdopodobnie może także obniżać ich zdolność do tworzenia przerzutów.

6.1. Inhibitory reduktazy tioredoksyny

Reduktaza tioredoksyny ma w swojej cząsteczce ruchome ramię C-końcowe, zawierające selenocysteinę, które podczas katalizowanych reakcji jest łatwo dostępne dla cząsteczek inhibitorów [50,56]. Miejsce katalityczne znajdujące się w tym rejonie białka może być selektywnie i nieodwracalnie modyfikowane przez różne związki o charakterze elektrofilowym. Ze względu na to, że miejsce katalityczne reduktazy jest bardzo podobne w swej strukturze i funkcji do miejsca katalitycznego reduktazy glutationowej, opracowywane inhibitory reduktazy tioredoksyny musi charakteryzować wyjątkowo wysoka specyficzność [2]. Okazuje się jednak, że aktywność reduktazy tioredoksyny jest istotna w przebiegu embriogenezy, a izoforma mitochondrialna (TrxR2) odgrywa ważną rolę w rozwoju i funkcjonowaniu serca. Stąd też hamowanie tego enzymu musi być procesem kontrolowanym i wykorzystywanym z uwzględnieniem ewentualnych skutków ubocznych [16,5]. Z drugiej strony, TrxR2 wydaje się być wyjątkowo atrakcyjnym celem dla nowych terapii, ze względu na jej umiejscowienie w mitochondriach. Okazuje się, że zahamowanie aktywności TrxR2 powoduje permeabilizację błony mitochondriów i uwolnienie cytochromu c [32,33]. Często okazuje się, że w komórkach, w których obserwuje się zwiększone wytwarzanie TrxR, pojawia się także oporność na leki, których mechanizm działania opiera się na zwiększonym wytwarzaniu reaktywnych form tlenu [21]. Zastosowanie niektórych inhibitorów TrxR, np. auranofiny, umożliwia uzyskanie efektu cytotoksycznego w komórkach o wykazanej oporności na cisplatynę [24].

Należy podkreślić, że utleniona forma reduktazy tioredoksyny jest oporna na działanie większości poznanych inhibitorów, a sam proces hamowania jest tu złożoną, kilkietapową

reakcją uwzględniającą stałe Michaelisa-Menten poszczególnych miejsc katalitycznych. Podstawowe inhibitory i ich zastosowanie przedstawiono w tabeli 1.

6.2. Inhibitory tioredoksyny

Okazuje się, że wiele z dotychczas poznanych inhibitorów tioredoksyny wykazuje istotny, hamujący wpływ na proliferację komórek nowotworowych. Dlatego też wciąż poszukiwane są nowe substancje specyficznie łączące się z cząsteczkami tioredoksyny. Jednym z ostatnio poznanych inhibitorów jest PX-12 (2- metylpropyl 1-imidazolyl disulphate) [49]. Jego działanie opiera się na nieodwracalnej alkilacji Cys73 w tioredoksynie 1. Związek ten wykazuje przeciwnowotworowe działanie w badaniach na myszach, którym wszczepione zostały ludzkie komórki nowotworowe [18]. Obecnie PX-12 jest w trakcie badań klinicznych. Związki o podobnym działaniu przedstawiono w tabeli 2.

TABELA 2. Inhibitory tioredoksyn

Inhibitor Trx	Opis
PMX464 benzotiazol podstawnikiem cykloheksadionanu	Inhibitor działa poprzez hamowanie proliferacji oraz wykazuje cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworowych. Efekt ten zwiększa się, gdy komórki znajdują się w stanie hipoksji [27]
MOL 294	Działanie przeciwzapalne, udowodnione na podstawie mysiego modelu astmy [19,13]
AJM290, AW464	Udowodniony wpływ na ekspresję i trwałość czynnika HIF-1 α (<i>Hypoxia-inducible factor 1 alpha</i>) [17, 28]
PX12	Wykazuje działanie przeciwnowotworowe, również antyangiogenne [18]

7. PODSUMOWANIE

Działanie białek układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny podlega wielopoziomowej kontroli i regulacji. Wyniki eksperymentów potwierdzają jak ważne jest zachowanie odpowiedniego poziomu ekspresji poszczególnych jego elementów. Obniżenie aktywności, jednego ze składników układu zwiększa między innymi wrażliwość komórki na stres oksydacyjny oraz zmniejsza aktywność wielu czynników transkrypcyjnych, wywierając wpływ na przebieg kolejnych procesów komórkowych. Z drugiej strony również zwiększone wytwarzanie Trx lub TrxR jest dla organizmu niebezpieczne, gdyż istotnie wpływa na zmniejszenie skuteczności działania mechanizmów, mających na celu wyeliminowanie komórki (np. w procesie apoptozy). Co więcej, układ ten stanowi obronę komórek nowotworowych przed stosowanymi terapiami i zapewnia im wydajną proliferację. Na tej podstawie uważa się, że inhibitory układu tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny będą w przyszłości ważnym elementem, najprawdopodobniej łączonych terapii przeciwnowotworowych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BERRY MJ, BANU L, LARSEN PR. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 1991 Sep 19; **353**(6341): 273–276.
- [2] BITEROVA EI, TURANOV AA, GLADYSHEV VN, BARYCKI JJ. Crystal structures of oxidized and reduced mitochondrial thioredoxin reductase provide molecular details of the reaction mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**:15018–15023.
- [3] BIZZARRI C, HOLMGREN A, PEKKARI K, CHANG G, COLOTTA F, GHEZZI P, BERTINI R. Requirements for the different cysteines in the chemotactic and desensitizing activity of human thioredoxin. *Antioxid Redox Signal* 2005; **7**: 1189–1194.
- [4] CASSIDY PB, EDES K, NELSON CC, PARSAWAR K, FITZPATRICK FA, MOOS PJ. Thioredoxin reductase is required for the inactivation of tumor suppressor p53 and for apoptosis induced by endogenous electrophiles. *Carcinogenesis* 2006 Dec; **27**(12): 2538–2549.
- [5] CONRAD M, JAKUPOGLU C, MORENO SG, LIPPL S, BANJAC A, SCHNEIDER M, BECK H, HATZOPoulos AK, JUST U, SINOWATZ F, SCHMAHL W, CHIEN KR, WURST W, BORNKAMM GW, BRIELMEIER M. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 9414–9423.
- [6] DAMDIMOPOULOS AE, MIRANDA-VIZUETE A, TREUTER E, GUSTAFSSON J A, SPYROU G. An alternative splicing variant of the selenoprotein thioredoxin reductase is a modulator of estrogen signaling. *J Biol Chem* 2004; **279**: 38721–38729.
- [7] DAMMEYER P, DAMDIMOPOULOS A, NORDMAN T, JIMENEZ A, MIRANDA VIZUETE A, ARNER ES. Induction of cell membrane protrusions by the N-terminal glutaredoxin domain of a rare splice variant of human thioredoxin reductase 1. *J Biol Chem* 2008 Feb 1; **283**(5): 2814–2821.
- [8] DAS KC, GUO X, WHITE CW. Induction of thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in lungs of newborn primates by oxygen. *Am J Physiol* 1999 Mar; **276**(3 Pt 1): L530–539.
- [9] FANG J, LU J, HOLMGREN A. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity. *J Biol Chem* 2005, Jul 1; **280**(26): 25284–25290.
- [10] FREEMERMAN AJ, GALLEGOS A, POWIS G. Nuclear factor kappaB transactivation is increased but is not involved in the proliferative effects of thioredoxin overexpression in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 1999; **59**: 4090–4094.
- [11] FURMAN C, RUNDLÖF AK, LARIGAUDERIE G, JAYE M, BRICCA G, COPIN C, KANDOUSSI AM, FRUCHART JC, ARNÉ ES, ROUIS M. Thioredoxin reductase 1 is upregulated in atherosclerotic plaques: specific induction of the promoter in human macrophages by oxidized low-density lipoproteins. *Free Radic Biol Med* 2004 Jul 1; **37**(1): 71–85.
- [12] GAN L, YANG XL, LIU Q, XU HB. Inhibitory effects of thioredoxin reductase antisense RNA on the growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biochem* 2005 Oct 15; **96**(3): 653–664.
- [13] HENDERSON WR JR, CHI EY, TEO JL, NGUYEN C, KAHN M. A small molecule inhibitor of redox-regulated NF-kappa B and activator protein-1 transcription blocks allergic airway inflammation in a mouse asthma model. *J Immunol* 2002 Nov 1; **169**(9): 5294–5299.
- [14] HIROTA K, MURATA M, SACHI Y, NAKAMURA H, TAKEUCHI JKM, YODOI J. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappa B. *J Biol Chem* 1999; **274**: 27891–27897.
- [15] HOFMANN ER, BOYANAPALLI M., LINDNER DJ., WEIHUA X, HASSEL BA, JAGUS R, GUTIERREZ PL, KALVAKOLANU DV. Thioredoxin reductase mediates cell death effects of the combination of beta interferon and retinoic acid. *Mol Cell Biol* 1998 Nov; **18**(11): 6493–6504.
- [16] JAKUPOGLU C, PRZEMECK GK, SCHNEIDER M, MORENO SG, MAYR N, HATZOPoulos AK, DE ANGELIS MH, WURST W, BORNKAMM GW, BRIELMEIER M, CONRAD M. Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 1980–1988.
- [17] JONES DT, PUGH CW, WIGFIELD S, STEVENS MF, HARRIS AL. Novel thioredoxin inhibitors paradoxically increase hypoxia-inducible factor-alpha expression but decrease functional transcriptional activity, DNA binding, and degradation. *Clin Cancer Res* 2006 Sep 15; **12**(18): 5384–5394.
- [18] KIRKPATRICK DL, KUPERUS M, DOWDESWELL M, POTIER N, DONALD LJ, KUNKEL M, BERGGEN M, ANGULO M, POWIS G. Mechanisms of inhibition of the thioredoxin growth factor system by antitumor 2-imidazolyl disulfides. *Biochem Pharmacol* 1998 Apr 1; **55**(7): 987–994.

- [19] KULDO JM, WESTRA J, ASGEIRSDÓTTIR SA, KOK RJ, OOSTERHUIS K, ROTS MG, SCHOUTEN JP, LIMBURG PC, MOLEMA G. Differential effects of NF- κ B and p38 MAPK inhibitors and combinations thereof on TNF- α - and IL-1 β -induced proinflammatory status of endothelial cells *in vitro*. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005 Nov; **289**(5): C1229–239.
- [20] LAURENT TC, MOORE EC, REICHARDP. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem* 1964; **239**: 3436–3444.
- [21] LIM HW, HONG S, JIN W, LIM S, KIM SJ, KANG HJ, PARK EH, AHN K, LIM CJ. Up-regulation of defense enzymes is responsible for low reactive oxygen species in malignant prostate cancer cells. *Exp Mol Med* 2005 Oct 31; **37**(5): 497–506.
- [22] LINCOLN DT, ALI EMADI EM, TONISSEN KF, CLARKE FM. The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. *Anticancer Res* 2003 May-Jun; **23**(3B): 2425–2433.
- [23] LOW S. C, BERRY MJ. Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 1996 Jun; **21**(6): 203–208.
- [24] MARZANO C, GANDIN V, FOLDA A, SCUTARI G, BINDOLI A, RIGOBELLO MP. Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2007 Mar 15; **42**(6): 872–881.
- [25] MAU B, POWIS G. Inhibition of cellular thioredoxin reductase by diaziquone and doxorubicin. Relationship to the inhibition of cell proliferation and decreased ribonucleotide reductase activity. *Biochem Pharmacol* 1992 Apr 1; **43**(7): 1621–1627.
- [26] MIX H, LOBANOV AV, GLADYSHEV VN. SECIS elements in the coding regions of selenoprotein transcripts are functional in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**(2): 414–423.
- [27] MUKHERJEE A, HUBER K, EVANS H, LAKHANI N, MARTIN S. A cellular and molecular investigation of the action of PMX464, a putative thioredoxin inhibitor, in normal and colorectal cancer cell lines. *Br J Pharmacol* 2007 Aug; **151**(8): 1167–1175.
- [28] MUKHERJEE A, WESTWELL AD, BRADSHAW TD, STEVENS MF, CARMICHAEL J, MARTIN SG. Cytotoxic and antiangiogenic activity of AW464 (NSC 706704), a novel thioredoxin inhibitor: an *in vitro* study. *Br J Cancer* 2005 Jan 31; **92**(2): 350–358.
- [29] PEKKARI K, GOODARZI MT, SCHEYNIUS A, HOLMGREN A, AVILA-CARINO J. Truncated thioredoxin (Trx80) induces differentiation of human CD14⁺ monocytes into a novel cell type (TAMs) via activation of the MAP kinases p38, ERK, and JNK. *Blood* 2005; **105**: 1598–1605.
- [30] POWIS G, WIPF P, LYNCH SM, BIRMINGHAM A, KIRKPATRICK DL. Molecular pharmacology and antitumor activity of palmarumycin-based inhibitors of thioredoxin reductase. *Mol Cancer Ther* 2006 Mar; **5**(3): 630–636.
- [31] RHEE SG, CHAE HZ, KIM K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 2005; **38**: 1543–1552.
- [32] RIGOBELLO MP, MESSORI L, MARCON G, CINELLU MA, BRAGADIN M, FOLDA A et al. Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. *J Inorg Biochem* 2004; **98**: 1634–1641.
- [33] RIGOBELLO MP, VIANELLO F, FOLDA A, ROMAN C, SCUTARI G, BINDOLI A. Differential effect of calcium ions on the cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **343**: 873–878.
- [34] RUNDLOF AK, JANARD M, MIRANDA-VIZUETE A, ARNER ESJ. Evidence for intriguingly complex transcription of human thioredoxin reductase 1. *FreeRad Biol Med* 2004; **36**: 641–656.
- [35] RYAN HE, LO J, JOHNSON RS. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998 Jun 1; **17**(11): 3005–3015.
- [36] SAKURAIA, YUASA K, SHOJIY, HIMENOS, TSUJIMOTOM, KUNIMOTOM, IMURAN, HARAS. Overexpression of thioredoxin reductase 1 regulates NF- κ B activation. *J Cell Physiol* 2004 Jan; **198**(1): 22–30.
- [37] SASADA T, NAKAMURA H, UEDA S, SATO N, KITAOKA Y, GON Y, TAKABAYASHI A, SPYROU G, HOLMGREN A, YODOI J. Possible involvement of thioredoxin reductase as well as thioredoxin in cellular sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Free Radic Biol Med* 1999 Sep; **27**(5–6): 504–514.
- [38] SCHALLREUTER KU, WOOD JM. The role of thioredoxin reductase in the reduction of free radicals at the surface of the epidermis. *Biochem Biophys Res Commun* 1986 Apr 29; **136**(2): 630–637.
- [39] SEEMANN S, HAINAUT P. Roles of thioredoxin reductase 1 and APE/Ref-1 in the control of basal p53 stability and activity. *Oncogene* 2005 Jun 2; **24**(24): 3853–3863.
- [40] SMART DK, ORTIZ KL, MATTSON D, BRADBURY CM, BISHT KS, SIECK LK, BRECHBIEL MW, GIUS D. Thioredoxin reductase as a potential molecular target for anticancer agents that induce oxidative stress. *Cancer Res* 2004 Sep 15; **64**(18): 6716–6724.

- [41] STREICHER KL, SYLTE MJ, JOHNSON SE, SORDILLO LM. Thioredoxin reductase regulates angiogenesis by increasing endothelial cell-derived vascular endothelial growth factor. *Nutr Cancer* 2004; **50**(2): 221–231.
- [42] SU D, GLADYSHEV VN. Alternative splicing involving the thioredoxin reductase module in mammals: a glutaredoxin-containing thioredoxin reductase 1. *Biochemistry* 2004 Sep 28; **43**(38): 12177–12188.
- [43] TESHIGAWARA K, MAEDA M, NISHINO K, NIKAIIDO T, UCHIYAMA T, TSUDO M, WANO Y, YODOI J. Adult T leukemia cells produce a lymphokine that augments interleukin 2 receptor expression. *J Mol Cell Immunol* 1985; **2**(1): 17–26.
- [44] THIRUNAVUKKARASU M, PENUMATHSA SV, KONERU S, JUHASZ B, ZHAN L, OTANI H, BAGCHI D, DAS DK, MAULIK N. Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. *Free Radic Biol Med* 2007 Sep 1; **43**(5): 720–729.
- [45] UEDA S, MASUTANI H, NAKAMURA H, TANAKA T, UENO M, YODOI J. Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal* 2002; **4**: 405–414.
- [46] UENO M, MASUTANI H, ARAI RJ, YAMAUCHI A, HIROTA K, SAKAI T, INAMOTO T, YAMAOKA Y, YODOI J, NIKAIIDO T. Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J Biol Chem* 1999 Dec 10; **274**(50): 35809–35815.
- [47] WANG X, ZHANG J, XU T. Cyclophosphamide as a potent inhibitor of tumor thioredoxin reductase *in vivo*. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007 Jan 1; **218**(1): 88–95.
- [48] WELSH SJ, BELLAMY WT, BRIEHL M, POWIS G. The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor-1 protein expression: Trx-1 over-expression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced angiogenesis. *Cancer Res* 2002 Sep 1; **62**(17): 5089–5095.
- [49] WELSH SJ, WILLIAMS RR, BIRMINGHAM A, NEWMAN DJ, KIRKPATRICK DL, POWIS G. The thioredoxin redox inhibitors 1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide and pleurotin inhibit hypoxia-induced factor 1 α and vascular endothelial growth factor formation. *Mol Cancer Ther* 2003 Mar; **2**(3): 235–243.
- [50] WILLIAMS CH, ARSCOTT LD, MÜLLER S, LENNON BW, LUDWIG ML, WANG PF, VEINE DM, BECKER K, SCHIRMER RH. Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 6110–6117.
- [51] WITTE AB, ANESTĂL K, JERREMALM E, EHRSSON H, ARNÉR ES. Inhibition of thioredoxin reductase but not of glutathione reductase by the major classes of alkylating and platinum containing anticancer compounds. *Free Radic Biol Med* 2005 Sep 1; **39**(5): 696–703.
- [52] YODOI J, TURSZ T. ADF, a growth-promoting factor derived from adult T cell leukemia and homologous to thioredoxin: involvement in lymphocyte immortalization by HTLV-I and EBV. *Adv Cancer Res* 1991; **57**: 381–411.
- [53] YOKOMIZO A, ONO M, NANRI H, MAKINO Y, OHGA T, WADA M, OKAMOTO T, YODOI J, KUWANO M, KOHNO K. Cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to cisplatin, mitomycin C, doxorubicin, and etoposide. *Cancer Res* 1995; **55**: 4293–4296.
- [54] YOO MH, XU XM, CARLSON BA, PATTERSON AD, GLADYSHEV VN, HATFIELD DL. Targeting thioredoxin reductase 1 reduction in cancer cells inhibits self-sufficient growth and DNA replication. *PLoS ONE* 2007 Oct 31; **2**(10): e1112.
- [55] YOUNG SW, QING F, HARRIMAN A, SESSLER JL, DOW WC, MODY TD, HEMMI GW, HAO Y, MILLER RA. Gadolinium(III) texaphyrin: a tumor selective radiation sensitizer that is detectable by MRI. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 6610–6615.
- [56] ZHONG L, HOLMGREN A. Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *J Biol Chem* 2000; **275**: 18121–18128.

Redaktor prowadzący – Lilla Hryniewiecka

Otrzymano: 15.05. 2008 r.

Przyjęto: 01.08. 2008 r.

Zakład Immunologii Centrum Biostruktury AM

ul. Banacha 1a, Blok F, 02-097 Warszawa

e-mail: angelikaszokalska@gmail.com