

TIOREDOKSYNA I REDUKTAZA TIOREDOKSYNY W PATOGENEZIE WYBRANYCH CHORÓB CZŁOWIEKA, CZĘŚĆ II

THIOREDOXIN AND THIOREDOXIN REDUCTASE IN THE
PATHOGENESIS OF SELECTED HUMAN DISEASES, PART II

Marcin POPIELARSKI¹, Halszka PONAMARCZUK¹, Katarzyna KUSIŃSKA,
Maria ŚWIĄTKOWSKA¹

¹ Zakład Cytobiologii i Proteomiki, Katedra Nauk Biomedycznych,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie: Tioredoksyna i reduktaza tioredoksyny tworzą układ białek określany, jako układ tioredoksyny. Układ tioredoksyny jest zaangażowany w ochronę komórki przed stresem oksydacyjnym, regulację apoptozy oraz przeciwdziałanie nowotworzeniu. Nieprawidłowe funkcjonowanie układu tioredoksyny związane jest z patogenezą określonych chorób człowieka, także z rozwojem nowotworów. W przypadku niektórych rodzajów nowotworów obserwuje się podwyższony poziom ekspresji genu dla tioredoksyny oraz reduktazy tioredoksyny, co wiąże się z nasiloną proliferacją, indukcją angiogenezy oraz hamowaniem procesów proapoptotycznych. Nadekspresja genu dla tioredoksyny oraz reduktazy tioredoksyny, zaliczana jest do procesów, które mogą prowadzić do wytworzenia leukoporności przez komórki po transformacji nowotworowej. Inhibitory tioredoksyny oraz reduktazy tioredoksyny są obecnie coraz powszechniej stosowane w leczeniu nowotworów, a wyniki terapii z ich użyciem są bardzo obiecujące.

Słowa kluczowe: tioredoksyna, reduktaza tioredoksyny, nowotwory, stres oksydacyjny, apoptoza

Summary: Thioredoxin and thioredoxin reductase form a thioredoxin system, which is involved in protecting cells against oxidative stress, regulation of apoptosis and regulation of tumorigenesis. Defects in thioredoxin system are associated with the pathogenesis of many human diseases, including the development of cancer. Overexpression of thioredoxin and thioredoxin reductase leads to increased proliferation, angiogenesis and initiation of anti-apoptotic pathways. Increased levels of thioredoxin and thioredoxin reductase are considered to be one of the mechanisms correlated with drug resistance in malignant cells. We can observe growing evidences suggesting the role of thioredoxin and thioredoxin reductase inhibitors in treatment of tumors. Results of therapy using thioredoxin and thioredoxin reductase inhibitors seems to be very promising.

Key words: thioredoxin, thioredoxin reductase, cancers, oxidative stress, apoptosis

Wykaz stosowanych skrótów: **Akt** – kinaza serynowo-treoninowa inaczej nazywana białkową kinazą B (ang. *Apoptosis signal-regulating kinase*); **API** – białko aktywatorowe 1 (ang. *Activator Protein 1*); **ASK1** – kinaza regulująca sygnały apoptotyczne (ang. *Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*); **ER** – siateczka śródplazmatyczna (ang. *Endoplasmic Reticulum*); **H₂O₂** – nadtlenek wodoru; **HDAC** – deacetylazy histonowe (ang. *Histone Deacetylases*); **HIF-1** – czynnik białkowy odpowiedzi na hipoksję (ang. *Hypoxia Induced Factor-1*); **HRE** – sekwencja regulatorowa, aktywowana hipoksją (ang. *Hipoxia Response Elements*); **MAPK** – kinazy aktywowane mitogenem (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*); **MGd** – moteksafina gadolinu (ang. *Motexafin Gadolinium*); **MMAC1** – białko o aktywności fosfatazy, którego gen ulega mutacji w wielu różnych nowotworach (ang. *Mutated In Multiple Advanced Cancers-1*); **NADPH** – forma zredukowana fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadnienowego (ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*); **NF-κB** – jądrowy czynnik transkrypcyjny (ang. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*); **PTEN** – gen supresorowy kodujący białko będące homologiem fosfatazy i angiotensyny usuniętej z chromosomu 10 (ang. *Phosphatase Ant Tensin Homolog*); **Ref-1** – czynnik regulacyjny stanu redoks (ang. *Redox effector factor-1*); **ROS** – reaktywne formy tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*); **TBP2** – białko będące regulatorem aktywności tioredoksyny (ang. *Tioredoxin Binding Protein 2*); **Trx** – tioredoksyna (ang. *Thioredoxin*); **TrxR** – reduktaza tioredoksyny (ang. *Thioredoxin Reductase*); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*)

WSTĘP

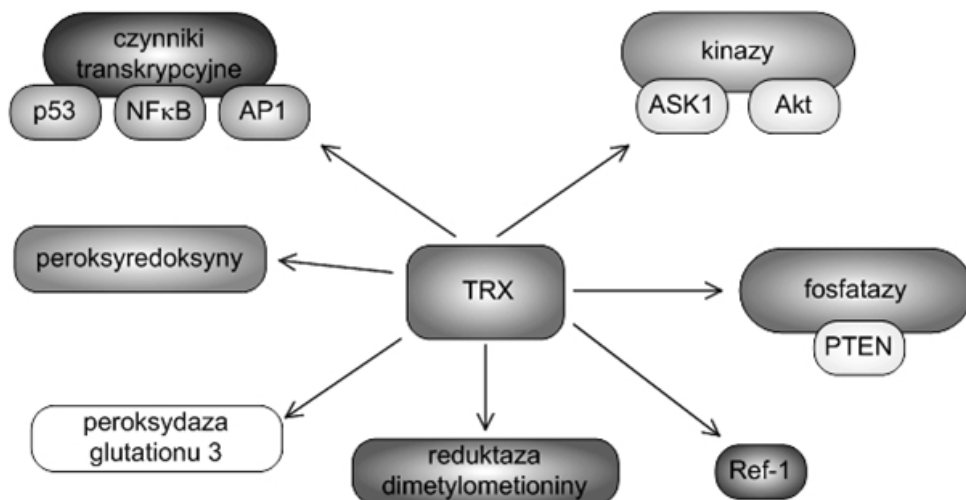
W poprzedniej części artykułu, poświęconej udziałowi tioredoksyny i reduktazy tioredoksyny w patogenezie wybranych chorób człowieka, przybliżyliśmy czytelnikowi budowę strukturalną Trx oraz TrxR, zasadę funkcjonowania układu tioredoksyny oraz rolę, jaką ten układ może odgrywać w rozwoju chorób wirusowych, chorób układu krążenia oraz chorób neurodegeneracyjnych. W drugiej części pragniemy pokrótce przedstawić rolę układu tioredoksyny w procesach, które mogą prowadzić do rozwoju nowotworów. Postaramy się także zwrócić uwagę czytelnika na możliwość zastosowania Trx i TrxR, jako potencjalnych celów w terapii leczenia nowotworów.

Udział systemu tioredoksyny w procesach związanych z nowotworzeniem, skupia się przede wszystkim, choć nie tylko, na regulacji stresu oksydacyjnego i procesów apoptozy.

UDZIAŁ STRESU OKSYDACYJNEGO W INDUKOWANIU APOPTOZY

Reaktywne formy tlenu, powstają w komórkach organizmów tlenowych w warunkach fizjologicznych, głównie w mitochondriach, a w mniejszej ilości także w siateczce śródplazmatycznej ER oraz w błonach jądrowych [38]. Pod-

stawowym źródłem ROS w mitochondriach jest łańcuch transportu elektronów, gdzie około 1-2% tlenu cząsteczkowego, metabolizowanego przez komórkę, ulega przekształceniom do form reaktywnych [127]. Jeżeli ROS powstają w nadmiarze to białkowe i niebiałkowe układy, odpowiedzialne za ich usuwanie, mogą funkcjonować z niedostateczną wydajnością. W konsekwencji dochodzi do nagromadzenia ROS w komórce, co powoduje wystąpienie zjawiska określanego mianem stresu oksydacyjnego. W wyniku stresu oksydacyjnego, dochodzi do uszkodzenia lipidów na drodze ich peroksydacji, uszkodzenia białek poprzez ich fragmentację, karbonylację lub agregację oraz uszkodzenia materiału genetycznego w wyniku utleniania zasad azotowych i szkieletu cukrowego DNA [53, 87]. Wszystkie wymienione powyżej zjawiska mogą pośrednio lub bezpośrednio indukować procesy apoptozy. Peroksydacja lipidów błony mitochondriów, zainicjowana przez ROS, powoduje zwiększenie przepuszczalności błony, co ułatwia uwolnienie z mitochondriów cytochromu *c*. Cytochrom *c* jest niezbędny do utworzenia kompleksu pośredniczącego w apoptozie – apoptosomu, który odpowiada za indukowanie szlaku promującego śmierć komórki, zachodzącą w wyniku fragmentacji DNA [108]. ROS mogą zainicjować programowaną śmierć komórki także w sposób bardzo specyficzny np. poprzez stymulowanie zależnego od H_2O_2 uwolnienia cytochromu *c* z mitochondriów [51, 88]. ROS biorą również udział w regulacji aktywności czynników transkrypcyjnych, cytokin, czynników wzrostu, a nawet hormonów. ROS funkcjonują, jako elementy złożonych mechanizmów przekazywania sygnału w obrębie i pomiędzy komórkami [37, 112].



RYCINA 1. Schemat ogólny substratów dla tioredoksyny
FIGURE 1. Enzymatic substrates for thioredoxin

Jak wspomniano wcześniej, Trx bierze udział w ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym. Podstawową rolę enzymatyczną Trx jest redukcja cytoplazmatycznych oraz mitochondrialnych preoksyredoksyn, czyli enzymów usuwających H_2O_2 [93]. Trx bierze udział w ochronie DNA przed stresem oksydacyjnym, poprzez regulację aktywności reduktazy dimetylmetyoniny, która usuwa utlenione formy metioniny [109]. Trx przeprowadza także reakcję redukcji peroksydazy glutationu 3. Regulacja poziomu utlenienia peroksydazy glutationu 3 przez Trx umożliwia współdziałanie układu tioredoksyny z innym układem bardzo wydajnie usuwającym ROS, który zależy jest od glutationu (ryc. 1) [9].

Blokowanie aktywności tioredoksyny lub reduktazy tioredoksyny, która jest jedynym białkiem zdolnym przeprowadzać Trx do formy aktywnej, prowadzi do utraty wydajności enzymów o charakterze preoksyredoksyn. Zablockowanie mechanizmów usuwających ROS prowadzi do ich akumulacji w komórce, a następnie uszkodzeń lipidów, białek oraz DNA, a w konsekwencji do śmierci komórki [114].

TRX I SZLAKI APOPTOTYCZNE

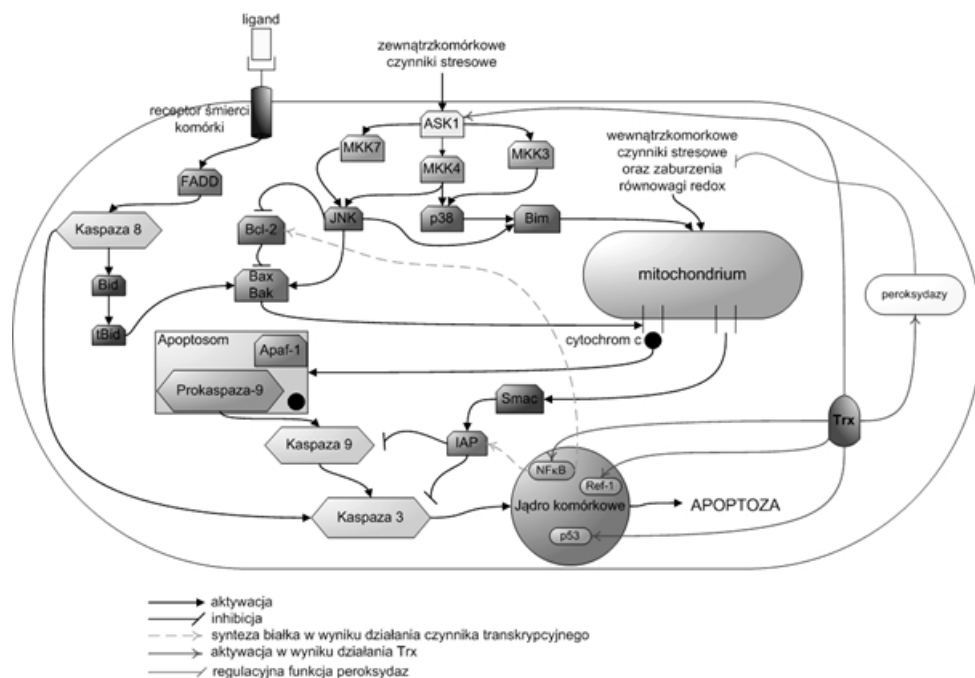
Trx bierze udział w regulowaniu procesu apoptozy w sposób pośredni i bezpośredni (ryc. 2, ryc. 3). Pośrednio Trx reguluje programowaną śmierć komórki poprzez udział w mechanizmach usuwających ROS, których nagromadzenie w komórce może zainicjować apoptozę. Bezpośrednio Trx reguluje proces apoptozy w wyniku interakcji z białkiem ASK1, które należy do szlaku kinaz zależnych od mitogenu MAPK [102]. Kinaza ASK1 na drodze fosforylacji aktywuje inne kinazy szlaku MAPK, które biorą udział w aktywacji proapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 takich jak Bax oraz Bim [57]. Bim stymuluje wspomniany wcześniej, istotny etap apoptozy, jakim jest uwolnienie cytochromu *c* z mitochondriów [65]. ASK1 inicjuje aktywację czynnika transkrypcyjnego p53, który nazywany bywa „strażnikiem genomu”, gdyż pełni kluczową rolę w procesach regulacji różnicowania i śmierci komórki [11].

Trx przeciwdziała inicjacji szlaków apoptotycznych, zależnych od ASK1. Trx promuje ubikwitynylację białka ASK1, co prowadzi do degradacji ASK1 w proteasomach [68]. Interakcja pomiędzy Trx, a kinazą ASK1 jest zależna od poziomu utlenienia tioredoksyny. Trx w formie zredukowanej, czyli aktywnej enzymatycznie, przyłącza się do N-końcowego fragmentu białka ASK1. Przyłączenie Trx do ASK1 blokuje aktywność kinazową ASK1, co w konsekwencji prowadzi do zablockowania szlaku kinaz MAPK inicjujących proces apoptozy. Trx w formie utlenionej, czyli nieaktywnej enzymatycznie, nie wykazuje możliwości łączenia się do ASK1 i blokowania procesu apoptozy [55, 102]. Trx może pozostawać w formie utlenionej, która nie blokuje proapoptotycznego działania ASK1, na skutek zablockowania redukującej aktywności TrxR. Również akumulacja ROS w komórce wymusza „zu-

życie” puli zredukowanej Trx na aktywację peroksyredoksyn i innych czynników usuwających ROS [93]. Następujące w wyniku działania ROS utlenienie cząsteczki Trx przyłączonej wcześniej do ASK1, powoduje oddysocjowanie Trx i aktywację ASK1. Jest to kolejny przykład udziału ROS w indukcji procesu apoptozy [114].

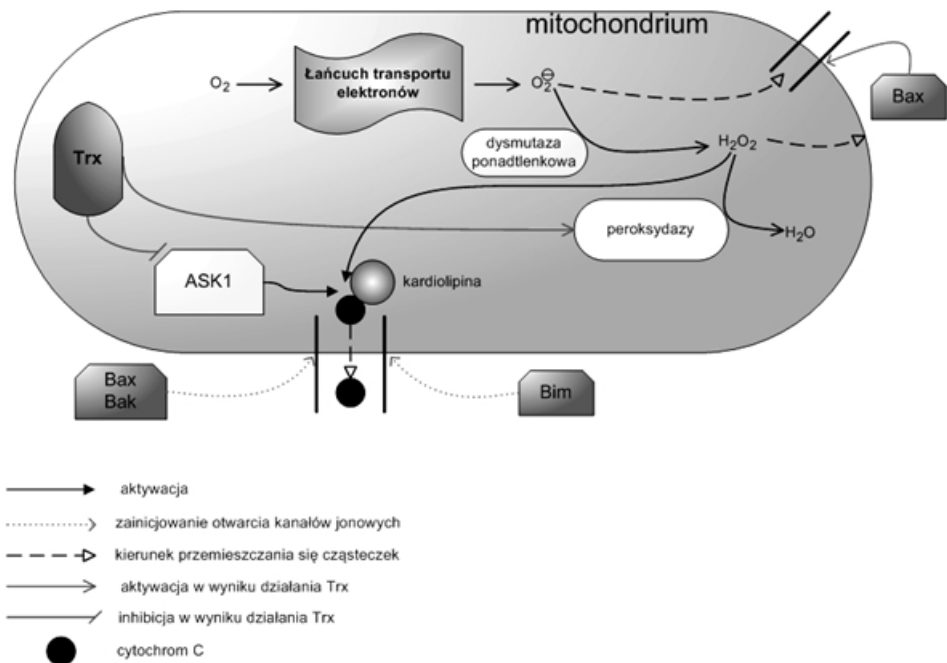
Tioredoksyna może pośredniczyć w procesie inaktywacji prokaspazy 3. Prokaspaza 3 jest proapoptotycznym czynnikiem, zaangażowanym w śmierć komórki na drodze zależnej od utworzenia apoptosomu [59, 82]. Trx przeprowadza redukcję jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, co umożliwia temu białku wiązanie się do DNA [69]. Czynnika transkrypcyjnego NF- κ B odpowiada za ekspresję genów, których produkty białkowe wykazują działanie antyapoptotyczne np. Bcl-2 [106].

Trx oddziałuje z produktem białkowym genu *PTEN*. Gen *PTEN* jest genem supresorowym, który koduje białko PTEN będące homologiem fosfatazy i angiotensyny usuniętej z chromosomu 10. Białko PTEN to 3-fosfataza fosfatydyloinozytolo-3-4-5-trifosforanu. Inna nazwa białka PTEN to białko ulegające mutacji w wielu różnych nowotworach MMAC1 [79]. PTEN odpowiedzialne jest za odłączanie reszt fosforanowych od cząsteczek lipidów błony komórkowej. PTEN jest inhibitorem kinazy Akt, która odpowiada za aktywację antyapoptotycznego białka Bad oraz czynników transkrypcyjnych z rodziny κ B, związanych z regulacją proliferacji komórek.



RYCINA 2. Udział cytoplazmatycznej tioredoksyny w regulacji apoptozy

FIGURE 2. Involvement of cytoplasmic thioredoxin in regulation of apoptosis



RYCINA 3. Udział mitochondrialnej tioredoksyny w regulacji apoptozy
FIGURE 3. Involvement of mitochondrial thioredoxin in regulation of apoptosis

PTEN blokuje aktywność kinazy Akt na drodze defosforylacji pierścienia inozytolu, obecnego w cząsteczce Akt [48]. W komórkach, w których aktywność białka PTEN jest zablockowana, dochodzi do nadmiernej aktywacji kinazy Akt. Konsekwencją nadmiernej aktywacji Akt jest stymulacja procesów antyapoptotycznych i inhibicja programowanej śmierci komórki [107]. Aktywność PTEN może zostać zablockowana na skutek mutacji w genie *PTEN*. Mutacje w genie *PTEN* powodują niekontrolowany wzrost i proliferację komórek. Mutacje w genie *PTEN* obserwuje się w przypadku znacznej liczby nowotworów człowieka [27].

Aktywność PTEN jest regulowana przez Trx pośrednio oraz bezpośrednio. Trx reguluje aktywność PTEN pośrednio poprzez zależną od utleniającego działania H_2O_2 , odwracalną inaktywację PTEN [64]. Bezpośrednio Trx-1 oddziałuje z białkiem PTEN w obrębie domeny odpowiedzialnej za wiązanie się do błony komórkowej. Przyłączenie cząsteczki tioredoksyny do PTEN przyczynia się do zahamowanie aktywności enzymatycznej tego białka. Przyłączenie Trx do PTEN powoduje także utworzenie przestrzennej przeszkody, która uniemożliwia wiązanie się PTEN

z błoną komórkową. Inaktywacja PTEN na drodze zależnej od aktywności Trx, może być powodem niekontrolowanej aktywności kinazy Akt w komórkach nowotworowych, w których nie obserwuje się mutacji genu *PTEN* [79].

Rola Trx w regulacji procesów apoptotycznych nie jest jednostronna. Trx stymuluje aktywność czynnika transkrypcyjnego p53, który jak wspomniano wcześniej, reguluje cykl komórkowy i pełni rolę inicjatora procesów apoptotycznych. Interakcja pomiędzy Trx i p53 ma charakter promujący apoptozę i stoi w wyraźnej sprzeczności do antyapoptotycznego modelu aktywności Trx. Należy jednak pamiętać, że białko p53 ulega inaktywacji w wielu różnych nowotworach. Proapoptotyczne procesy zależne od współdziałania Trx i p53 mogą nie mieć miejsca w komórkach po transformacji nowotworowej [3, 99, 115].

W związku z udziałem Trx w procesach apoptotycznych warto wspomnieć o roli Trx w mechanizmach regulujących podziały komórkowe. Jak wspomniano wcześniej, Trx przeprowadza reakcje redukcji mostków disiarczkowych w czynnikach transkrypcyjnych, związanych z regulacją apoptozy i przeżycia komórki. Rozerwanie mostków disiarczkowych w białkach o aktywności czynników transkrypcyjnych, jest zazwyczaj związane z ich aktywacją, gdyż umożliwia im tworzenie kompleksów lub ułatwia wiązanie się do DNA. Taki proces ma miejsce w przypadku czynnika NF- κ B, który odpowiada za ekspresję licznych białek regulujących cykl komórkowy.

Istnieją czynniki transkrypcyjne, które nie oddziałują bezpośrednio z Trx, ale ich aktywność zależy od poziomu utlenienia. Białka te ulegają aktywacji za pośrednictwem czynnika regulującego stan redoks 1 Ref-1. Ref-1 posiada aktywność endonukleazy i bierze udział w naprawie DNA na drodze wycinania zasad. Ref-1, niezależnie od udziału w procesach naprawy materiału genetycznego, ułatwia wiązanie się czynników transkrypcyjnych do DNA. Rola Ref-1 w aktywacji czynników transkrypcyjnych polega na przeprowadzeniu reakcji redukcji czynnika transkrypcyjnego, co umożliwia mu wiązanie się do nici DNA [26, 96]. Ref-1 ulega redukcji w wyniku działania Trx, co umożliwia utrzymanie Ref-1 w aktywnej enzymatycznie formie. Ref-1 w formie zredukowanej, przeprowadza aktywację czynników transkrypcyjnych, inicjujących ekspresję genów, których produkty białkowe odpowiedzialne są za stymulowanie przeżycia komórki i unikanie apoptozy w niekorzystnych warunkach tj. niedotlenienie czy stres oksydacyjny [96, 97]. Spośród czynników transkrypcyjnych indukowanych przez interakcję Trx/Ref-1, należy wymienić NF- κ B, p53 oraz białko aktywatorowe 1 AP-1 [49]. AP1 reguluje ekspresję białek w odpowiedzi na działanie cytokin, czynników wzrostu, czynników stresu komórkowego oraz infekcję bakteryjne lub wirusowe. AP1 bierze udział w licznych procesach komórkowych, w tym także w stymulowaniu wzrostu i różnicowania komórek oraz regulacji apoptozy [1, 2, 121].

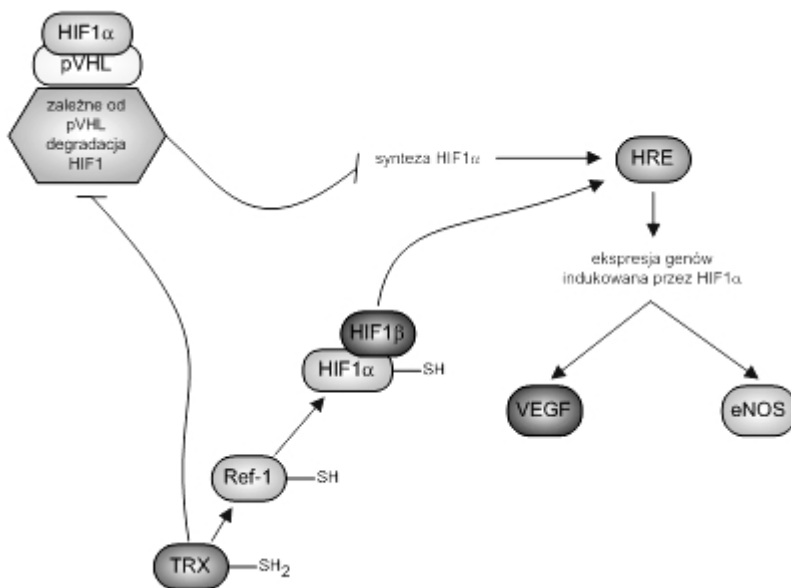
TRX I HIPOKSJA

Zjawisko hipoksji, czyli niedoboru tlenu w tkance, ma miejsce w przypadku, gdy ilość tlenu cząsteczkowego, dostępnego dla komórek spada poniżej prawidłowego poziomu. Hipoksja może prowadzić do aktywacji procesów inicjujących angiogenezę, czyli tworzenie nowych naczyń krwionośnych. Angiogeneza jest szczególnie istotna w rozwoju nowotworów, gdyż prowadzi do unaczynienia guza pierwotnego i tworzenia przerzutów [30]. Zjawisko hipoksji ma swoje fizjologiczne znaczenie podczas etapu embriogenezy, gdzie jest niezbędne do prawidłowego rozwoju organizmu [83].

W konsekwencji wystąpienia hipoksji dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego HIF-1. Białko HIF-1 składa się z dwóch podjednostek: HIF-1 α oraz HIF-1 β . Podjednostka HIF-1 β nie jest kontrolowana przez poziom tlenu w tkance i obecna jest w komórkach we względnie stałym stężeniu. Podjednostka HIF-1 α ulega inaktywacji w wyniku degradacji zależnej od poziomu tlenu w tkance [52]. W warunkach niedotlenienia HIF-1 α nie ulega degradacji i ilość cząsteczek HIF-1 α w komórkach stopniowo wzrasta. Następnie HIF-1 α ulega stabilizacji i przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie tworzy w pełni funkcjonalny dimer z HIF-1 β . Kompleks HIF-1 α oraz HIF-1 β ma aktywność czynnika transkrypcyjnego. Przeprowadza ekspresję genów, które zawierają sekwencję regulatorową aktywowaną hipoksją HRE. Wśród białek, które ulegają ekspresji w wyniku działania czynnika HIF-1 obecne są białka biorące udział w metabolizmie beztlenowym, angiogenezie oraz hematopoezie [31].

Trx wpływa na aktywność HIF-1 pośrednio (ryc. 4), poprzez regulację poziomu stresu oksydacyjnego i przeciwdziałanie generowaniu reaktywnych form tlenu. ROS wykazują zdolność do hamowania degradacji HIF-1 α w warunkach normoksji. Pojęcie normoksji opisuje stan prawidłowego stężenia tlenu w tkance. Udział ROS w stabilizacji HIF-1 α i aktywacji HIF-1 w warunkach hipoksji jest procesem skomplikowanym i niejednoznacznym [7, 19, 56]. Przyjmuje się, że obecność H₂O₂ w cytoplazmie komórki, przyspiesza i ułatwia stabilizację HIF-1 α w warunkach hipoksji. Niewykluczone, że udział H₂O₂ jest czynnikiem niezbędnym w hamowaniu degradacji HIF-1 α [56]. Również reaktywne formy azotu takie jak tlenek azotu, mogą wpływać na blokowanie degradacji HIF-1 α poprzez reakcje nitrozytacji reszt cysteinowych HIF-1 α [66].

Trx reguluje funkcje czynnika HIF-1 także bezpośrednio (ryc. 4), poprzez regulację utlenienia podjednostki HIF-1 α . Redukcja HIF-1 α umożliwia w pełni funkcjonalnemu, dimerowi HIF-1 łączenie się z koaktywatorami, niezbędnymi do zainicjowania procesów transkrypcji genów odpowiedzi na hipoksję [31]. W warunkach hipoksji Trx współdziała z białkiem Ref-1 w stymulowaniu aktywności HIF-1. Trx wspólnie z Ref-1 modyfikuje pojedynczą resztę cysteinowej HIF-1 α co prowadzi do stabilizacji całej podjednostki [55]. Trx oddziałuje z HIF1- α także w warunkach normoksji.



RYCINA 4. Udział tioredoksyiny w regulacji zjawiska hipoksji
FIGURE 4. Involvement of thioredoxin in regulation of hypoxia

Trx wpływa na stabilizację podjednostki HIF1- α w cytoplazmie, co prowadzi do ekspresji genów odpowiedzi na hipoksje, także w warunkach normalnego stężenia tlenu w komórce [7, 75]. W komórkach z nadekspresją genu na tioredoksynę, obserwuje się podwyższony poziom HIF-1 α , wydajniejsze wiązanie się HIF-1 do DNA oraz nasilenie ekspresji genów zależnych od HIF-1 [24, 119] tj. czynnik wzrostu śródbłonna naczyń VEGF. Komórki z nieaktywną Trx wykazują obniżony poziom podjednostki HIF-1 α w cytoplazmie

UKŁAD TIOREDOKSYNY W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Reasumując powyższe rozważania można przyjąć, że układ tioredoksyiny jest silnie powiązany ze zjawiskiem transformacji nowotworowej. Tioredoksyna bierze udział w negatywnej regulacji zjawiska apoptozy, przeciwdziała stresowi oksydacyjnemu i wynikającym z niego uszkodzeniom w obrębie komórki, wpływa na procesy angiogenezy i odpowiedzi na hipoksję. Wszystkie te funkcje mogą dowodzić pozytywnej roli układu tioredoksyiny w regulowaniu cyklu komórkowego. Pozytywna rola Trx w komórkach prawidłowych staje się rolą negatywną

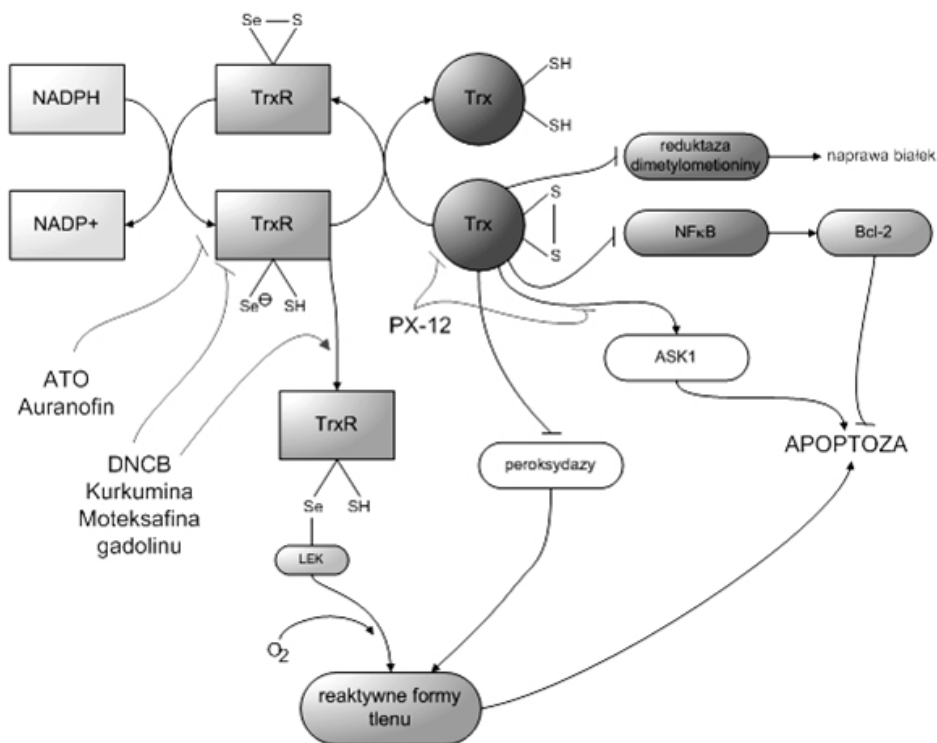
w komórkach po transformacji nowotworowej. W komórkach nowotworowych tioredoksyna bierze udział w niekontrolowanej proliferacji, blokowaniu apoptozy, unaczynienie guza, tworzenie przerzutów, czy nawet w procesach odpowiedzialnych za wytworzenia lekooporności.

Podwyższony poziom ekspresji genów dla tioredoksyny i reduktazy tioredoksyny obserwuje się w różnych rodzajach nowotworów takich jak nowotwory płuc [58], szyjki macicy [46], piersi [18], białaczki i chłoniaki [104]. Podwyższony poziom ekspresji genu dla Trx uważany jest za jeden z czynników, które powodują wytworzenia lekooporność nowotworu, w przypadku chemioterapii z użyciem cisplatyny [125], czy docetaxelu [50, 60]. Podwyższony poziom ekspresji genu dla Trx, wiąże się zazwyczaj z gorszymi prognozami i krótszym czasem przeżycia pacjentów [16, 67].

Zastosowanie czynników blokujących aktywność Trx, w założeniu, prowadziło by do zmiany potencjału redoks komórek po transformacji nowotworowej. Miałyby to miejsce na skutek drastycznego zmniejszenia wydajności, lub nawet całkowitego zablokowania, układów usuwających ROS. Stres oksydacyjny, spowodowany akumulacją ROS, prowadziły do bezpośrednich uszkodzeń białek, lipidów i kwasów nukleinowych, a w konsekwencji do zainicjowania procesów proapoptotycznych. Zablokowanie aktywności Trx mogłoby także prowadzić do aktywacji procesu apoptozy na drodze zależnej od ASK1. Inhibicja Trx prowadziły do zablokowania antyapoptotycznego i stymulującego podziały działania białek, których geny ulegają ekspresji w wyniku aktywności czynników AP1 oraz NF- κ B. Kolejną konsekwencją zablokowania Trx byłaby inhibicja genów odpowiedzi na hipoksję, Obniżenie lub zablokowanie ekspresji genów zależnych od aktywności HIF-1, w tym przede wszystkim VEGF, prowadziły do zablokowania procesu unaczynienia guzów.

Trx nie stanowi jedyne elementu układu tioredoksyny, który mógłby posłużyć za cel terapii przeciwnowotworowej. Zablokowanie TrxR wydaje się równie obiecującą perspektywą w leczeniu chorób nowotworowych. Inhibicja aktywności TrxR jest o tyle wydajniejsza, że białko to jest jedynym czynnikiem przeprowadzającym Trx z formy nieaktywnej w aktywną. Większość funkcji Trx zależy od jej poziomu utlenienia. Trx w formie utlenionej nie może brać udziału w usuwaniu ROS, nie blokuje proapoptotycznego działania ASK1, nie stymuluje aktywności czynników transkrypcyjnych, nie bierze udziału w ekspresji genów odpowiedzi na hipoksję. Zablokowanie redukującej aktywności TrxR, w założeniu, spowodowałoby akumulację Trx w formie utlenionej, która nie spełniałaby tych swoich funkcji, które zależą od poziomu utlenienia.

Spośród związków chemicznych, blokujących aktywność systemu Trx-TrxR, które stanowią potencjalne środki terapeutyczne w terapii nowotworów, warto wymienić: PX-12, SAHA, auranofin, tritlenek arsenu, moteksafinę gadolinu, DNCB, kurkuminę oraz flawonoidy (ryc. 5).



RYCINA 5. Zastosowanie inhibitorów tioredoksyiny oraz reduktazy tioredoksyiny w terapii przeciwnowotworowej

FIGURE 5. Application of thioredoxin and thioredoxin reductase inhibitors in anti-cancer treatment

1-metylo-propylo-2-imidiazolodiosiarcezek inaczej PX-12 [90] powoduje nieodwracalną alkilację cysteiny w pozycji 73 łańcucha aminokwasowego Trx1. Alkilacja Cys-73 blokuje proces redukcji Trx1 katalizowany przez TrxR1. W konsekwencji dochodzi do akumulacji Trx1 w formie utlenionej, indukcji apoptozy w wyniku destabilizacji oddziaływania Trx-ASK1, osłabienia aktywacji czynnika HIF-1 oraz zmniejszenia ekspresji VEGF [5, 61, 62, 120]. PX-12 jest tolerowany przez pacjentów w stosunkowo wysokiej dawce, bo nawet w ilości 226mg/m², podawanej w czasie 72h co 21 dni [92]. Niestety w drugiej fazie badań klinicznych efekty stosowania PX-12 nie były tak dobre jak oczekiwano. U pacjentów z zaawansowanym nowotworem trzustki z przerzutami, którym podawano wcześniej gemcytabinę, obserwowano brak znaczącej aktywności przeciwnowotworowej PX-12. Rezultaty te były tym bardziej rozczarowujące, że pacjenci ci posiadali niezwykle niski poziom Trx1 [6, 91]

SAHA należy do grupy enzymów deacetylaz histonowych HDAC, które odpowiedzialne są za modyfikacje histonów. Deacetylacja histonów prowadzi do remodelowania chromatyny, a tym samym wpływa na stan jej upakowania. Zmiany upakowania chromatyny mogą wyłączać bądź włączać ekspresję określonych genów [76]. Deacetylazy histonowe mogą inicjować nadekspresję licznych genów, w tym także genu dla tioredoksyny. Zwiększona ekspresja genu dla Trx1 spowodowaną aktywnością HDAC, ma miejsce w komórkach prawidłowych, lecz nie w komórkach po transformacji nowotworowej. Sugeruje to możliwość zastosowania HDAC, jako bardzo wybiórczych związków w terapii przeciwnowotworowej, które nie powodowałyby nadekspresji genu dla tioredoksyny w komórkach nowotworowych. [77] W wyniku użycia SAHA dochodzi do nadekspresji białka wiążącego Trx TBP-2, które jest negatywnym regulatorem Trx, blokującym jego aktywność, jako buforu stanu redoks komórki [12]. Użycie SAHA w terapii przeciwnowotworowej prowadzi do akumulacji ROS [116] oraz aktywacji apoptozy na drodze zależnej od białka ASK1 [111, 116].

Spośród inhibitorów TrxR, które znalazłyby zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej, duże nadzieje wiąże się ze związkami, zawierającymi w swoich cząsteczkach atom metalu, zwłaszcza złota [8, 85]. Jednym z tych związków jest (I)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo-1-tio- β -D-glukopiranozyd S-trietylofosfinozłota znany pod nazwą auranofin. Auranofin blokuje aktywność TrxR będącej formie zredukowanej, już w ilościach nanomolarnych [42] także w przypadku nowotworów odpornych na cisplatynę [78]. W wyniku zastosowania auranofinu obserwuje się zahamowanie aktywności mitochondrialnej TrxR [95], akumulację ROS oraz indukcję apoptozy w konsekwencji uwolnienia cytochromu *c* z mitochondriów na drodze zależnej od H₂O₂ [78, 95]. Inny związek chemiczny zawierający cząsteczkę złota to aurotiogluukoza, która już w ilości 0,025mg/g masy ciała wykazuje zdolność do długotrwałej i niespecyficzej miejscowo inhibicji TrxR [73]. Spośród pozostałych związków o budowie podobnej do auranofinu, będących inhibitorami TrxR, można wyróżnić AuBiPy, AuXil, AuPy [23, 94], związki zawierające fragmenty łańcucha cukrowego [123], związki zdolne do emisji światła [89], związki zawierające rozpuszczalne w wodzie ligandy fosfinowe [122], niezwykle wydajne związki nieposiadające pierścienia cyklicznego [39] oraz wiele innych [35, 47, 101]. Ostatnio pojawiły się także związki złota połączone z N-heterocyklicznym karbenem pochodzącym z benzoimidiazolu. Związki te cechują się mniejszą wydajnością niż pochodne auranofinu, ale jednocześnie posiadają inną budowę strukturalną oraz wykazują większą wybiórczość względem TrxR niż w stosunku do białek systemu glutationu [100].

Cis-diamino-dichloroplatyna inaczej cisplatyna, od dawna była używana, jako lek przeciwnowotworowy. Cisplatyna wykazuje zdolność do blokowania aktywności TrxR, łącząc się z jej formą zredukowaną za pośrednictwem selenocysteiny [103]. Również inne związki zawierające platynę mogą być używane w terapii przeciwnowotworowej, jako inhibitory aktywności TrxR: kompleksy z pochodną

pirydyny – terpirydyną [4, 69], karboplatyna, oksoplatyna [122] czy kompleksy z furanokarbohydrydami [81]. Wszystkie wymienione związki blokują aktywność układu tioredoksyiny poprzez łączenie się z selenocysteina TrxR.

Inne inhibitory TrxR, zawierające w swoich cząsteczkach atom metalu, to kompleksy z rtęcią [15, 117], rutenem [14, 84] oraz gadolinem [44]. Szczególnie dużym zainteresowaniem cieszy się moteksafina gadolinu (MGd), MGd generuje znaczne ilości ROS, co przyczynia się do nasilenia stresu oksydacyjnego w komórkach [74]. Zastosowanie MGd powoduje inhibicję aktywności TrxR1, jako reduktazy, ale nasila aktywność TrxR1 jako zależnej od NADPH oksydazy, co przyczynia się do generowania jeszcze większych ilości ROS. Pośrednie zahamowanie aktywności Trx w wyniku zablokowania TrxR, w terapii z użyciem MGd prowadzi do indukcji apoptozy na drodze zależnej od białka ASK1 [44].

Także kompleksy z niemetalami bądź półmetalami mogą znaleźć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej, polegającej na blokowaniu aktywności układu tioredoksyiny. Zawierający atom selenu związek o nazwie BBSKE funkcjonuje, jako substrat TrxR współzawodnicząc z Trx [129] i blokuje aktywność TrxR w nowotworach prostaty [105]. Skonstruowano wiele związków zawierających w swych cząsteczkach atom telluru, w tym pochodne rozpuszczalne w wodzie, analogi witaminy E, związki o budowie sterydów, lipidów, aminokwasów, kwasów nukleinowych czy nawet inhibitorów poliamin. Najbardziej wydajne z powyższych wydają się być związki rozpuszczalne w wodzie, zawierające grupy siarkopropylowe [34, 32, 33]. Ostatnią grupę związków tworzą pochodne disiarczków oraz izotiocyjanianów: disiarczek diallilowy, izotiocyjanian allilowy, izotiocyjanian benzylowy, izotiocyjanian pentylowy i inne [10, 113]. Wszystkie wymienione powyżej związki blokują aktywność systemu tioredoksyiny poprzez łączenie się do TrxR, w większości przypadków za pośrednictwem selenocysteiny.

Tritlenek arsenu znany też potocznie, jako arsenik używany jest w leczeniu białaczki promielocytowej [20, 28]. Tritlenek arsenu ma bardzo szerokie spektrum działania na komórkę, wliczając w to także indukcję apoptozy na drodze zależnej od zmiany potencjału błony mitochondriów [80]. Tritlenek arsenu powoduje nieodwracalną inhibicję TrxR będącej w formie zredukowanej, co prowadzi do zablokowania systemu Trx-TrxR [70]

1-chloro-2,4-dinitrobenzen, inaczej DNCB, to związek nitroaromatyczny, który podobnie jak MGd może blokować aktywność reduktazy TrxR, jednocześnie nasilając aktywność TrxR, jako oksydazy. Zastosowanie DNCB prowadzi do znacznej akumulacji ROS w komórce, a w konsekwencji indukcji apoptozy [86]. Istnieje również cały szereg innych związków funkcjonujących na zasadzie nieodwracalnej alkilacji selenocysteiny centrum aktywnego TrxR. Spośród tych związków możemy wyróżnić: 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (DNFB), kwas jodoctowy, kwas bromoocetowy, chlorambucyl, busulfan, melfalan, nitrozomoczniki [41, 86] Trzeba jednak pamiętać o tym, że jedynie bardzo nieliczne z tych związków nadają się do prób terapeutycznych.

Kurkumina, polifenol pochodzący z azjatyckiej przyprawy kurkumy, posiada wiele cennych właściwości leczniczych [40, 45]. Kurkumina prawdopodobnie reguluje niektóre szlaki sygnałowe inicjujące procesy ochronne dla komórki [21, 54, 98]. Co ciekawe, kurkumina posiada także aktywność utleniającą i może przyczyniać się do generowania dużej ilości ROS [43, 63]. Kurkumina tworzy kompleks z TrxR wiążąc się do centrum aktywnego, co powoduje nieodwracalną inaktywację TrxR. Nowopowstały kompleks kurkumina-TrxR nie może redukować Trx, a dodatkowo wykazuje aktywność utleniającą zależną od NADPH, co przyczynia się do generowania ROS [36, 13]

Inne polifenole, a także flawonoidy i chinony, również posiadają właściwości przeciwnowotworowe i mogą służyć, jako inhibitory układu tioredoksyny. Wśród polifenoli blokujących funkcje TrxR możemy wyróżnić: kwas elagowy, kwas koruloelagowy [110], oraz dwa główne polifenole zielonej herbaty: galusan epikatechiny i galusan epigalokatechiny [29, 118, 128]. Flawonoidy łączą się do cząsteczek TrxR za pośrednictwem swoich grup hydroksylowych, powodując inhibicję układu tioredoksyny i wytwarzanie ROS. Do flawonoidów potencjalnie blokujących TrxR zaliczamy: mirycytę, kwercytnę, katechinę, taksyfolinę i pelargonidynę [25, 70, 71]. Chinony są podatne na reakcje utlenienia i redukcji, mogą więc służyć jako substraty TrxR i inhibitory redukcji Trx [17]. Chinony oraz odkryte niedawno indochinony, przeprowadzają nieodwracalną inhibicję TrxR w sposób zależny od obecności NADPH w czasie nawet 60 min [22, 126].

W związku z powyższym możemy przyjąć, że układ tioredoksyny stanowi obiecujący cel w leczeniu nowotworów człowieka. Obecnie pojawia się coraz więcej środków farmakologicznych, które poprzez blokowanie działania Trx lub TrxR, wykazują aktywność przeciwnowotworową. Inhibitory układu tioredoksyny nie stanowią uniwersalnej odpowiedzi na chorobę nowotworową, ale są coraz powszechniej i z coraz lepszą efektywnością stosowane, jako związki pomocnicze w terapii nowotworów.

LITERATURA

- [1] ABATE C, PATEL L, RAUSCHER FJ 3RD, CURRAN T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity *in vitro*. *Science* 1990; **249**: 1157-1161.
- [2] ANGEL P, KARIN M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1072**: 129-157.
- [3] ARNER ES, HOLMGREN A. The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; **16**: 420-426.
- [4] BECKER K, HEROLD-MENDE C, PARK JJ, LOWE G, SCHIRMER RH. Human thioredoxin reductase is efficiently inhibited by (2terpyridine)platinum(II)complexes. Possible implications for a novel antitumor strategy. *J Med Chem* 2001; **44**: 2784.
- [5] BAKER AF, DRAGOVICH T, TATE WR, RAMANATHAN RK. The antitumor thioredoxin-1 inhibitor PX-12 (1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide) decreases thioredoxin-1 and VEGF levels in cancer patient plasma. *J Lab Clin Med* 2006; **147**: 83-90.

- [6] BAN HS, UTO Y, NAKAMURA H. Hypoxia-inducible factor inhibitors: a survey of recent patented compounds (2004-2010). *Expert Opin Ther Pat* 2011; **21**: 131-146.
- [7] BELL EL, KLIMOVA TA, EISENBART J, MORAES CT, MURPHY MP, BUDINGER GR, CHANDEL NS. The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J Cell Biol* 2007; **177**: 1029-1036, 1905-1914.
- [8] BINDOLI A, RIGOBELLO MP, SCUTARI G, GABBIANI C, CASINI A, MESSORI L. Thioredoxin reductase: a target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coordinat Chem Rev* 2009; **253**: 1692-1707.
- [9] BJORNSTEDT M, XUE J, HUANG W, AKESSON B, HOLMGREN A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase, *J Biol Chem* 1994; **269**: 29382-29384.
- [10] BROWN KK, COX AG, HAMPTON MB. Mitochondrial respiratory chain involvement in peroxiredoxin 3 oxidation by phenethyl isothiocyanate and auranofin. *FEBS Lett* 2010; **584**:1257-1262.
- [11] BUSCHMANN T, POTAPOVA O, BAR-SHIRA A, IVANOV VN. Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 2743-2754.
- [12] BUTLER L, ZHOU X, XU W, SCHER H. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, upregulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 11700-11705.
- [13] CAI W, ZHANG B, DUAN D, WU J, FANG J. Curcumin targeting the thioredoxin system elevates oxidative stress in HeLa cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; **262**: 341-348.
- [14] CASINI A, GABBIANI C, SORRENTINO F, RIGOBELLO MP, BINDOLI A, GELDBACH TJ, MARRONE A, RE N, HARTINGER CG, DYSON PJ, MESSORI L. Emerging proteintargets for anticancer metallodrugs: inhibition of thioredoxin reductase andcathepsin B by antitumor ruthenium (II)-arene compounds. *Med Chem* 2008; **51**: 6773-6781.
- [15] CARVALHO CML, CHEW EH, HASHEMU SI, LU J, HOLMGREN A. Inhibition of thehuman thioredoxin system – a molecular mechanism of mercury toxicity. *J Biol Chem* 2008; **283**: 11913-11923.
- [16] CECCARELLI J, DELFINO L, ZAPPIA E, CASTELLANI P, BORGHINI M, FERRINI S, TOSETTI F, RUBARTELLI A. The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affects tumor progression and response to prooxidants. *Int J Cancer* 2008; **123**: 1770-1778.
- [17] CENAS N, PRAST S, NIVINSKAS H, SARLAUSKAS J, ARNER ES. Interactions of nitroaromatic compounds with the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase and the relation to induction of apoptosis in human cancer cells. *J Biol Chem* 2006; **281**: 5593-5603.
- [18] CHA MK, SUH KH, KIM IH. Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxinI in human breast carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; **28**: 93
- [19] CHANDEL NS, MCCLINTOCK DS, FELICIANO CE, WOOD TM, MELENDEZ JA, RODRIGUEZ AM, SCHUMACKER PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor -1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. *J Biol Chem* 2000; **275**: 25130-25138.
- [20] CHEN GQ, ZHU J, SHI XG, NI JH. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As2O3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood* 1996; **88**: 1052-1061.
- [21] CHEN MH, LEE MY, CHUANG JJ, LIY Z, NING ST, CHEN JC, LIU YW. Curcumin inhibits HCV replication by induction of heme oxygenase-1 and suppression of AKT. *Int J Mol Med* 2012; **30**: 1021-1028.
- [22] CHEW EH, LU J, BRADSHAW TW, HOLMGREN A. Thioredoxin reductase inhibitionby antitumor quinols: a quinol pharmacophore effect correlating to antiprolifera-tive activity. *FASEB J* 2008; **22**: 2072-2083.
- [23] CORONNELLO M, MINI E, CACIAGLI E, CINELLI MA, BINDOLI A, GABBIANI C, MESSORI L. Mechanisms of cytotoxicity of selected organogold(III) compounds. *J Med Chem* 2005, **48**: 6761-6765.

- [24] CSIKI I, YANAGISAWA K, HARUKI N, NADAF S, MORROW JD, JOHNSTON DH, CARBONE DP. Thioredoxin-1 modulates transcription of cyclooxygenase-2 *via* hypoxia-inducible factor-1alpha in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006; **66**: 143-150.
- [25] DAL PIAZ F, BRACA A, BELISARIO MA, DE TOMMASI N. Thioredoxin system modulation by plant and fungal secondary metabolites. *Curr Med Chem* 2010; **17**: 479-494.
- [26] DEMPLE B, HERMAN T, CHEN DS. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 11450-11454 .
- [27] DI CRISTOFANO A, PANDOLFI PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000; **100**: 387-390.
- [28] DOUER D, TALLMAN MS. Arsenic trioxide: New clinical experience with an old medication in hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 2396-2410.
- [29] DU YT, WU YF, CAO XL, CUI W, ZHANG HH, TIAN WX, JI MJ, HOLMGREN A, ZHONG L. W. Inhibition of mammalian thioredoxin reductase by black tea and its constituents: implications for anticancer actions. *Biochimie* 2009; **91**:434-444.
- [30] DUBOIS M, DELANNOY E, DULUC L, CLOSS E, LI H, TOUSSAINT C, GADEAU AP, GODECKE A, FREUND-MICHEL V, COURTOIS A, MARTHAN R, SAVINEAU JP, MULLER B. Biopterin Metabolism and eNOS Expression during Hypoxic Pulmonary Hypertension in Mice. *PLoS One* 2013; **8**: 82594.
- [31] EMA M, HIROTA K, MIMOURA J, ABE H, YODOI J, SOGAWA K, POELLINGER L, FUJII-KIURIYAMA Y. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J* 1999; **18**: 1905-1914.
- [32] ENGMAN L, AL-MAHARIK N, MCNAUGHTON M, BIRMINGHAM A, POWIS A. Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium antioxidants. *Anticancer Drugs* 2003; **14**: 153-161.
- [33] ENGMAN L, AL-MAHARIK N, MCNAUGHTON M, BIRMINGHAM A, POWIS A. Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells. *Bioorg Med Chem* 2003; **11**: 5091-5100.
- [34] ENGMAN L, KANDA T, GALLEGOS A, WILLIAMS R, POWIS G. Water-soluble organo-tellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of humancancer cells. *Anticancer Drug Des* 2000; **15**: 323-330.
- [35] ENGMAN L, MCNAUGHTON M, GAJEWSKA M, KUMAR S, BIRMINGHAM A, POWIS G. Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organogold(III) compounds. *Anticancer Drugs* 2006; **17**: 539-544.
- [36] 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; **280**: 25284-25290.
- [37] FINKEL T. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1998; **10**: 248-253.
- [38] FLUERY C, MIGNOTTE B, VAYSSIÈRE JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signalling. *Biochimie* 2002; **84**: 131-141.
- [39] GANDIN V, FERNANDES AP, RIGOBELLO MP, DAN I , SORRENTINO F, TISATO F, BJORNSTEDT M, BINDOLI A, STURARO A, RELLA R, MARZANO C. Cancer cell death induced by phosphine gold(I) compounds targeting thioredoxin reductase. *Biochem Pharmacol* 2010; **79**: 90-101.
- [40] GOEL A, KUNNUMAKKARA AB, AGGARWAL BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 2008; **75**: 787-809.
- [41] GORLATOV SN, STADTMAN TC, GORLATOV SN, STADTMAN TC. Human thioredoxin reductase from HeLa cells:selective alkylation of selenocysteine in the protein inhibits enzyme activityand reduction with NADPH influences affinity to heparin.Proc. Natl. Acad. Sci.U. S. A. **95**: 85208525; 1998.
- [42] GROMER S, AARSCOTT LD, WILLIAMS CH JR, SCHIRMER RH, BECKER K. Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J Biol Chem* 1998; **273**: 20096-20101.

- [43] HAN YM, SHIN DS, LEE YJ, ISMAIL IA, HONG SH, HAN DC, KWON BM. 2-Hydroxycurcuminoid induces apoptosis of human tumor cells through the reactive oxygen species-mitochondria pathway. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; **21**: 747-751.
- [44] HASHEMY SI, UNGERSTEDT JS, ZAHEDI AVVAL F, HOLMGREN A. Motexafin gadolinium, a tumor-selective drug targeting thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* 2006; **281**: 10691-10697.
- [45] HATCHER H, PLANALP R, CHO J, TORTI FM, TORTI SV. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**: 1631-1652.
- [46] HEDLEY D, PINTILIE M, WOO J, NICKLEE T, MORRISON A, BIRLE D, FYLES A, MILOSEVIC M, HILL R. Up-regulation of the redox mediators thioredoxin and apurinic/apyrimidinic excision (APE)/Ref-1 in hypoxic microregions of invasive cervical carcinomas, mapped using multispectral, wide-field fluorescence image analysis. *Am J Pathol* 2004; **164**: 557-565.
- [47] HICKEY JL, RUHAYEL RA, BARNARD PJ, BAKER MV, BERNERS-PRICE SJ, HICKEY JL, RUHAYFILIPOVSKA AA. Mitochondria targeted chemotherapeutics: the rational design of gold(I) N-heterocyclic carbene complexes that are selectively toxic to cancer cells and target protein selenols in preference to thiols. *J Am Chem Soc* 2008; **130**: 12570-12571.
- [48] HILL MM, HEMMINGS BA. Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2002; **93**: 243-251.
- [49] HIROTA K, MATSUI M., IWATA S, NISHIYAMA A, MORI K, YODOI J. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 3633-3638.
- [50] IWAO-KOIZUMI K, MATOBA R, UENO N, KIM SJ. Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 422-431.
- [51] KAGAN VE, TYURIN VA, JIANG J, TYURINA YY. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol* 2005; **1**: 223-232.
- [52] KALLIO PJ, WILSON WJ, O'BRIEN S, MAKINO Y, POELLINGER L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 1999; **274**: 6519-6525.
- [53] KANG DH. Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. *AACN Clin Issues* 2002; **13**: 540-54.
- [54] KAPAKOS G, YOUREVA V, SRIVASTAVA AK Attenuation of endothelin-1-induced PKB and ERK1/2 signaling, as well as Egr-1 expression, by curcumin in A-10 vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; **90**: 1277-1285.
- [55] KARLENIUS TC, TONISSEN KF. Thioredoxin and Cancer: A Role for Thioredoxin in all States of Tumor Oxygenation. *Cancers* 2010; **2**: 209-232.
- [56] KIETZMANN T, GORLACH A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol* 2005; **16**: 474-486.
- [57] KIM BJ, RYU SW, SONG BJ. JNK and p38 kinasemediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 2006; **281**: 21256-21265.
- [58] KIM HJ, CHAE HZ, KIM YJ, KIM YH, HWANGS TS, PARK EM, PARK YM. Preferential elevation of Prx I and Trx expression in lung cancer cells following hypoxia and in human lung cancer tissues. *Cell Biol Toxicol* 2003; **19**: 285-298.
- [59] KIM JE, TANNENBAUM SR. S-Nitrosation regulates the activation of endogenous procaspase-9 in HT-29 human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004; **279**: 9758-9764.
- [60] KIM SJ, MIYOSHI Y, TAGUCHI T, TAMAKI Y. High thioredoxin expression is associated with resistance to docetaxel in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 8425-8430.
- [61] KIRKPATRICK DL, KUPERUS M, DOWDESWELL M, PORTIER N. Mechanisms of inhibition of the thioredoxin growth factor system by antitumor 2-imidazolyl disulfides. *Biochem Pharmacol* 1998; **55**: 987-994.
- [62] KIRKPATRICK DL, EHRMANTRAUT G, STETTNER S, KUNKEL M, POWIS G. Redox active disulfides: The thioredoxin system as a drug target. *Oncol Res* 1997; **9**: 351-356.

- [63] KUO CL, WU SY, IP SW, WU PP, YU CS, YANG JS, CHEN PY, WU SH, CHUNG JG. Apoptotic death in curcumin-treated NPC-TW 076 human nasopharyngeal carcinoma cells is mediated through the ROS, mitochondrial depolarization and caspase-3-dependent signaling responses. *Int J Oncol* 2011; **39**: 319-328.
- [64] KWON J, LEE SR, YANG KS, AHN Y, KIM YJ, STADTMAN ER, RHEE SG.: Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 16419-164124.
- [65] LEI K, DAVIS RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 2432-2437.
- [66] LI F, SONVEAUX P, RABBANI ZN, LIU S, YAN B, HUANG Q, VUJASKOVIC Z, DEWHIRST MW, LI CY. Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation. *Mol Cell* 2007; **26**: 63-74.
- [67] LINCOLN DT, ALI EMADI EM, TONISSEN KF, CLARKE FM. The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. *Anticancer Res* 2003; **23**: 2425-2433.
- [68] LIU Y, MIN W. Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ Res* 2002; **90**: 1259-1266.
- [69] LO YC, KO TP, SU WC, SU TL, WANG AH. Terpyridine-platinum(II) complexes are effective inhibitors of mammalian topoisomerases and human thioredoxin reductase 1. *J Inorg Biochem* 2009; **103**: 1082-1092.
- [70] LU J, CHEW EH, HOLMGREN A. Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 12288-12293.
- [71] LU J, PAPP L, FANG JG, RODRIGUEZ-NIETO S, ZHIVOTOVSKY B, HOLMGREN A. Inhibition of mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: implications for myricetin and quercetin anticancer activity. *Cancer Res* 2006; **66**: 4410-4418.
- [72] LU J, PAPP LV, FANG J, RODRIGUEZ-NIETO S. Inhibition of Mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: Implications for myricetin and quercetin anticancer activity. *Cancer Res* 2006; **66**: 4410-4418.
- [73] MADEIRA JM, GIBSON DL, KEAN WF, KLEGERIS A. The biological activity of auranofin: implications for novel treatment of diseases. *Inflammopharmacology* 2012; **20**: 297-306.
- [74] MAGDA D, MILLER RA. Motexafin gadolinium A novel redox active drug for cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 2006; **16**: 466-476.
- [75] MANSFELD KD, GUZY RD, PAN Y, YOUNG RM, CASH TP, SCHUMACKER PT, SIMON MC. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-1 α activation. *Cell Metab* 2005, **1**: 393-399.
- [76] MARKS PA. Thioredoxin in cancer – Role of histone deacetylase inhibitors. *Semin Cancer Biol* 2006; **16**: 436-443.
- [77] MARKS PA, JIANG X. Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy. *Cell Cycle* 2005; **4**: 549-551.
- [78] MARZANO C, GANDIN V, FOLDA A, SCUTARI G: Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2007; **42**: 872-881.
- [79] MEUILLET EJ, MAHADEVAN D, BERGGREN M, COON A, POWIS G. Thioredoxin-1 binds to the C2 domain of PTEN inhibiting PTEN's lipid phosphatase activity and membrane binding: a mechanism for the functional loss of PTEN's tumor suppressor activity. *Arch Biochem Biophys* 2004; **429**: 123-133.
- [80] MILLER WH JR. Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells. *Oncologist* 2002; **7**: 14-19.
- [81] MILLET R, URIG S, JACOB J, AMTMANN E, MOULINOX JP, GROMER S, BECKER K, DAVIQUOUD-CHARVET E. Synthesis of 5-nitro-2-furancarbohydrazides and their cisdiamminedichloroplatinum complexes as bitopic and irreversible human thioredoxin reductase inhibitors. *J Med Chem* 2005; 48-7039.
- [82] MITCHELL DA, MORTON SU, FERNHOFF NB, MARLETTA MA: Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 11609-11614.

- [83] MORRIS GM, NEW DA. Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial neural folds and neural crest in cultured rat embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1979; 54: 17-35.
- [84] MURA P, CAMALLI M, BINDOLI A, SORRENTINO F, CASINI A, GABBIANI C, COSINI M, ZANELLO P, RIGOBELLO MP, MESSORI L. Activity of fructosylthioredoxin reductase is strongly decreased by trans-[bis(2-amino-5-methylthiazole)tetrachlororuthenate(III)]: first report of relevant thioredoxin reductase inhibition for a ruthenium compound. *J Med Chem* 2007; 50: 5871-5874.
- [85] NOBILI S, MINI E, LANDINI I, GABBIANI C, CASINI A, MESSORI L. Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. *Med Res Rev* 2012; 30: 550-580.
- [86] NORDBERG J, ZHONG L, HOLMGREN A, ARNER ES. Mammalian thioredoxin reductase is irreversibly inhibited by dinitrohalobenzenes by alkylation of both the redox active selenocysteine and its neighboring cysteine residue. *J Biol Chem* 1998; 273: 10835-10842.
- [87] ORRENIUS S, GOGWADZE V, ZHIVOTOVSKY B. Mitochondrial oxidative stress: Implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 143-183.
- [88] OTT M, ROBERTSON JD, GOGWADZE V, ZHOVOTOVSKY B, ORRENIUS S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12591-1263.
- [89] OTT I, QIAN X, XU Y, VLECKEN DH, MARQUES IJ, KUBUTAT D, WILL J, SHELDRIK WS, JESSE P, PROKOP A, BAGOWSKI. CPA gold(I) phosphine complex containing a naphthalimide ligand functions as a TrxR inhibiting antiproliferative agent and angiogenesis inhibitor. *J Med Chem* 2009; 52: 763-770.
- [90] POWIS G, KIRKPATRICK DL. Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7: 392-397.
- [91] RAMANATHAN RK, ABBRUZZESE J, DRAGOVICH T, KIRKPATRICK L, GUILLEN JM, BAKER AF, PESTANO LA, GREEN S, VON HOFF DD. A randomized phase II study of PX-12, an inhibitor of thioredoxin in patients with advanced cancer of the pancreas following progression after a gemcitabine-containing combination. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 67: 503-509.
- [92] RAMANATHAN RK, STEPHENSON JJ, WEISS GJ, PESTANO LA, LOWE A, HISCOX A, LEOS RA, MARTIN JC, KIRKPATRICK L, RICHARDS DA. A phase I trial of PX-12, a small-molecule inhibitor of thioredoxin-1, administered as a 72-hour infusion every 21 days in patients with advanced cancers refractory to standard therapy. *Invest New Drugs* 2012; 30: 1591-1596.
- [93] RHEE SG, CHAE HZ, KIM K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signalling. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 1543-1552.
- [94] RIGOBELLO MP, MESSORI L, MARCON G, CINELLU MA, BARAGADIN M, FOLDA A, SCUTARI G, BINDOLI A. Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. *J Inorg Biochem* 2004; 98: 1634-1641.
- [95] RIGOBELLO MP, SCUTARI G, BOSCOLO R, BINDOLI A. Induction of mitochondrial permeability transition by auranofin, a gold(I)-phosphine derivative. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 1162-1168.
- [96] ROBSON CN, HICKSON ID. Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/apyrimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in E. coli xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5519-5523.
- [97] ROBSON CN, MILNE AM, PAPPIN DJ, HICKSON ID. Isolation of cDNA clones encoding an enzyme from bovine cells that repairs oxidative DNA damage in vitro: homology with bacterial repair enzymes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 1087-1092.
- [98] ROCKS N, BEKAERT S, COIA I, PAULISSEN G, GUEDERS M, EVRARD B, VAN HEUNGEN JC, CHIAP P, FOIDART JM, NOEL A, CATALDO D. Curcumin-cyclodextrin complexes potentiate gemcitabine effects in an orthotopic mouse model of lung cancer. *Br J Cancer* 2012; 107: 1083-1092.
- [99] ROOS WP, KAINA B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 2006; 12: 440-450.
- [100] RUBBIANI R, KITANOVIC I, ALBORZINIA H, CAN S, KIRANOVIC A, ONAMBELE LA, STEFANOPOULOU M, GELDMACHER Y, SHELDRIK WS, WOLBER G, PROKOP A, WOLFL S, OTT I. Benzimidazol-2-ylidene gold(I) complexes are thioredoxin reductase inhibitors with multiple antitumor properties. *J Med Chem* 2010; 53: 8608-8618.

- [101] SAGGIORO D, RIGOBELLO MP, PALOSCHI L, SAGGIORO D, RIGOBELLO MP, PALOSCHI L, FOLDA A, MOGGACH SA, PARSONS S, RONCONI L, FREGONA D, BINDOLI A: Gold(III) – dithiocarbamate complexes induce cancer cell death triggered by thioredoxin redox system inhibition and activation of ERK pathway. *Chem Biol* 2007; **14**: 1128-1139.
- [102] SAITOH M, NISHITOH H, FUJII M, TAKEDA K, TOBIUME K, SAWADA Y. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 1998; **17**: 2596-2606.
- [103] SASADA T, NAKAMURA H, UEDA S, SATO N, KITAOKA Y, GON Y, TAKABAYASHI A, SPYTOU G, HOLMGREN A, YODOI JJ. Possible involvement of thioredoxin reductase as well as thioredoxin in cellular sensitivity to cis –diamminedichloroplatinum (II). *Free Radic Biol Med* 1999; **27**: 504-514.
- [104] SHAO L, DICCIANNI MB, TANAKA T, GRIBI R. Thioredoxin expression in primary T-cell acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic implication. *Cancer Res* 2001; **61**: 7333-7338.
- [105] SHI C, YU L, YANG F, YAN J, ZENG HA. A novel organoselenium compound induces cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **309**: 578-583.
- [106] SHISHODIA S, AGGARWAL BB. Nuclear factor-kappaB activation: A question of life or death. *J Biochem Mol Biol* 2002; **35**: 28-40.
- [107] SIMPSON L, PARSONS R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001; **264**: 29-41
- [108] SRINIVASULA SM, AHMAD M, FERNANDES-ALNEMRI T, AALNEMRI ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1- mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998; **1**: 949-957
- [109] STADTMAN ER, MOSKOVITZ J, BELRETT BS, LEVINE RL. Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. *Mol Cell Biochem* 2002; **234-235**: 3-9.
- [110] STURM N, HU Y, ZIMMERMANN H, FRITZ-WOLF K, WITTLIN S, RAHLFS S, BECKER K. Compounds structurally related to ellagic acid show improved antiplasmodial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 622-630.
- [111] TAN J, ZHAUNG L, JIANG X, YANG KK. Apoptosis signal-regulating kinase 1 is a direct target of E2F1 and contributes to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through positive feedback regulation of E2F1 apoptotic activity. *J Biol Chem* 2006; **281**: 10508-10515.
- [112] THANNICKAL VJ, FANBURG BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol* 2000; **279**: 1005-1028.
- [113] TIBODEAU JD, BENSON LM, ISHAM CR, OWEN WG, BIBLE KC. The anticancer agent chaetocin is a competitive substrate and inhibitor of thioredoxin reductase. *Antioxid Redox Signal* 2009; **11**: 1097-1106.
- [114] TONISSEN KF, DI TRAPANI G. Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Mol Nut. Food Res* 2009; **53**: 87-103.
- [115] UENO M, MASUTANI H, ARAI RJ, YAMAGUCHI A. Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 35809-35815.
- [116] UNGERSTEDT JS, SOWA Y, XU WS, SHAO Y. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 673-678.
- [117] WAGNER C, SUDATI JH, NOGUEIRA CW, ROCHA JB. In vivo and in vitro inhibition of thioredoxin reductase by methylmercury. *Biometals* 2010; **23**: 1177.
- [118] WANG Y, ZHANG H, HOLMGREN A, TIAN W, ZHONG L. Inhibitory effect of green tea extract and (–)-epigallocatechin-3-gallate on mammalian thioredoxin reductase and HeLa cell viability. *Oncol Rep* 2008; **20**: 1479-1489.
- [119] WELSH SJ, BELLAMY WT, BRIEHL MM, POWIS G. The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1α protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2002; **62**: 5089-5095.
- [120] 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 1α and vascular endothelial growth factor formation. *Mol Cancer Ther* 2003; **2**: 235-243.
- [121] WISDOM R. AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res* 1999; **253**: 180-185.

- [122] WITTE AB, ANESTAL K, JERREMALM E, EHRSSON H, ARNER 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; **39**: 696-703.
- [123] VERGARA E, CASINI A, SORENTINO F, ZAVA O, CERRADA E, RIGOBELLO MP, BIDNOLI A, LAGUNA M, DYSON PJ. Anticancer therapeutics that target selenoenzymes: synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity, and thioredoxin reductase inhibition of a series of gold(I) complexes containing hydrophilic phosphine ligands. *ChemMedChem* 2010; **5**: 96-102.
- [124] VIRY E, BATTAGLIA E, DEBORDE V, MULLER T, REAU R, DAVIQUOD-CHARVET E, BAGREL D. A Sugar-modified phosphole gold complex with antiproliferative properties acting as a thioredoxin reductase inhibitor in MCF-7 cells. *ChemMedChem* 2008; **3**: 1667-1670.
- [125] YAMADA M, TOMIDA A, YOSHIKAWA H, TAKETANI Y, TSURUO T. Increased expression of thioredoxin/adult T-cell leukemia-derived factor in cisplatin-resistant human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 1996; **2**: 427-432.
- [126] YAN C, SHIEH B, REIGAN P, ZHANG ZY, COLUCCI MA, CHILLOUX A, NEWSOME JJ, SIEGEL D, CHAN D, MOODY CJ, ROSS D. Potent activity of indolequinones against human pancreatic cancer: identification of thioredoxin reductase as a potential target. *Mol Pharmacol* 2009; **76**: 163-172.
- [127] ZHANG DX, GUTTERMAN DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; **292**: 2023-2031.
- [128] ZHANG H, CAO D, CUI W, JI M, QIAN X, ZHONG L. Molecular bases of thioredoxin and thioredoxin reductase-mediated prooxidant actions of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Free Radic Biol Med* 2010; **49**: 2010-2018.
- [129] ZHAO R, MASAYASU H, HOLMGREN A. Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a super-fast thioredoxin oxidant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 8579-8584.

Redaktor prowadzący – Krzysztof Lewandowski

Otrzymano: 15.11.14

Przyjęto: 07.01.15

Marcin Popielarski

Zakład Cytobiologii i Proteomiki, Katedra Nauk Biomedycznych

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

ul Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

tel. 798-552-746

e-mail: marcin.popielarski87@gmail.com

