

## 폐포상피세포, 대식세포를 비롯한 각종 세포주에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Peroxiredoxin 동위효소들의 산화에 따른 불활성화와 재생

아주대학교 의과대학 호흡기 내과학교실, 의료정보학과<sup>1</sup>

오윤정, 김영선, 최영인, 신승수, 박주현, 최영화, 박광주, 박래웅<sup>1</sup>, 황성철

### Oxidative Inactivation of Peroxiredoxin Isoforms by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Pulmonary Epithelial, Macrophage, and other Cell Lines with their Subsequent Regeneration

Yoon Jung Oh, M.D., Young Sun Kim, B.S., Young In Choi, M.D., Seung Soo Shin, M.D., Joo Hun Park, M.D., Young Hwa Choi, M.D., Kwang Joo Park, M.D., Rae Woong Park, M.D.<sup>1</sup>, and Sung Chul Hwang, M.D.

Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Medical Informatics<sup>1</sup> Ajou University School of Medicine Suwon, Korea

**Background :** Peroxiredoxins (Prxs) are a relatively newly recognized, novel family of peroxidases that reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and alkylhydroperoxide into water and alcohol, respectively. There are 6 known isoforms of Prxs present in human cells. Normally, Prxs exist in a head-to-tail homodimeric state in a reduced form. However, in the presence of excess H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, it can be oxidized on its catalytically active cysteine site into inactive oxidized forms. This study surveyed the types of the Prx isoforms present in the pulmonary epithelial, macrophage, endothelial, and other cell lines and observed their response to oxidative stress.

**Methods :** This study examined the effect of exogenous, excess H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the Prxs of established cell lines originating from the pulmonary epithelium, macrophages, and other cell lines, which are known to be exposed to high oxygen partial pressures or are believed to be subject to frequent oxidative stress, using non-reducing SDS polyacrylamide electrophoresis (PAGE) and 2 dimensional electrophoresis.

**Result :** The addition of excess H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the culture media of the various cell-lines caused the immediate inactivation of Prxs, as evidenced by their inability to form dimers by a disulfide cross linkage.

This was detected as a subsequent shift to its monomeric forms on the non-reducing SDS PAGE. These findings were further confirmed by 2 dimensional electrophoresis and immunoblot analysis by a shift toward a more acidic isoelectric point (pI). However, the subsequent reappearance of the dimeric Prxs with a comparable, corresponding decrease in the monomeric bands was noted on the non-reducing SDS PAGE as early as 30 minutes after the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment suggesting regeneration after oxidation. The regenerated dimers can again be converted to the inactivated form by a repeated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, indicating that the protein is still catalytically active. The recovery of Prxs to the original dimeric state was not inhibited by a pre-treatment with cycloheximide, nor by a pretreatment with inhibitors of protein synthesis, which suggests that the reappearance of dimers occurs *via* a regeneration process rather than via the *de novo* synthesis of the active protein.

**Conclusion :** The cells, in general, appeared to be equipped with an established system for regenerating inactivated Prxs, and this system may function as a molecular “on-off switch” in various oxidative signal transduction processes. The same mechanisms might applicable other proteins associated with signal transduction where the active catalytic site cysteines exist. (*Tuberc Respir Dis 2005; 58:31-42*)

**Key words :** Pulmonary epithelium, Peroxiredoxins, Cysteine Oxidation, Regeneration

## 서 론

본 연구는 2002년도 아주대학교 대학원연구비 지원에 의해 이루어졌음

Address for correspondence : **Sung Chul Hwang, M.D.**  
Associate Professor

Department of Pulmonary and Critical Care Medicine  
Ajou University School of Medicine  
Suwon 442-749, Korea

Phone : 82-31-219-5123 & 5120

Fax : 82-31-219-5124 & 5109

E-mail : schwang@ajou.ac.kr

Received : Sep. 20. 2004

Accepted : Dec. 14. 2004

활성산소기 (reactive oxygen species ; superoxide anion, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등은 세포의 호흡과정이나 여러 종류의 호르몬, 성장인자, cytokine 및 신경전달 물질 등이 세포막 수용체를 통해서, 신호를 전달하는 과정에서 발생하며, 이때 발생한 활성산소기 들은, 이미 신호전달 물질로 잘 알려져 있는 NO 등과 함께, 새로운 세포내의 신호전달 물질로 대두되고 있는데, 특히 식작용을

하는 호중구나<sup>2-4</sup>나 대식세포<sup>5</sup>와 같은 면역세포에서 뿐만 아니라, 인체 폐조직의 섬유모세포<sup>6</sup>, 폐동맥 혈관 내피세포와 평활근세포<sup>7</sup> 및 상피세포<sup>8</sup> 등에서도 NADPH oxidase들이 존재하고, 이들이 산소 감지 기능과 함께 활성산소기를 발생시켜서 이들 물질을 통해 세포내의 신호 전달에 관여한다는 것이 알려진 이후로 활성산소기 또는 유리산소기와 관련된 연구가 최근 활발히 진행되고 있다<sup>9</sup>.

특히 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 경우는 제 2 신호전달물질로서 이미 많은 연구에서, 세포의 증식과 사멸 및 괴사에 관여하는 매개체로 인정받고 있는데, 이는 많은 질환에서 높은 농도로 발견되고, 확산이 자유로우며, 비교적 안정되며, 생성하는 효소와 소멸시키는 효소가 존재하기 때문이다<sup>10</sup>. 즉, 세포의 redox potential이 낮고, 소량의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 생성되는 경우는 세포의 성장을 촉진하는 방향으로 작용하지만, 반면에 redox potential이 높고 과량의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 발생한다면 세포 사멸로 진행된다고 이해되고 있다<sup>10</sup>. 자세히 설명하면, 세포내 신호전달 과정에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 발생하면, 이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 단백질의 활성부위에 cysteine을 갖는 여러 종류의 성장인자수용체, 사이토카인, protein-tyrosine phosphatase 및 caspase<sup>11</sup>의 활성 cysteine 부위를 불활성화하여<sup>9</sup>, 혈소판유도 성장인자, 및 상피세포 성장인자 등과 같은 성장인자의 신호를 증폭시키며, 단백질의 tyrosine 인산화, mitogen-activated protein kinase의 활성화, DNA 합성 및 화학주성 등이 촉진되게 된다<sup>12</sup>.

Peroxiredoxin은 거의 모든 생명체에 공통적으로 보존되어 있는 peroxidase로서, 현재까지 알려진 작용으로는, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 또는 alkylhydroperoxide를 환원시켜서 물과 알코올로 만드는 효소이다<sup>13-15</sup>. Peroxiredoxin의 종류는 세포질 내에 존재하는 Type I 과 II, 미토콘드리아 내부의 type III, 핵 내부에 Type I 과 II 등이 존재하며, endoplasmic reticulum 내에서 생성되고 분비되는 Type IV, 용해소체 내에 존재한다고 알려져 있는 Type V, 및 폐에 많다고 알려진 Type VI 등이 있다<sup>16</sup>.

저자 등이 함께 참여했던 기존의 보고에 따르면<sup>20</sup>, Prx 단백질이 높은 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 접하게 되면 Prx

효소의 작용 과정 중에 Prx의 활성 cysteine 잔기의 sulfidryl (-SH)기가 sulfinic acid (-SO<sub>2</sub>H)기로 산화되고, 다시 재생되는 것으로 보고하였으나<sup>20-22</sup>, 이러한 covalent modification으로 인한 변화가, 모든 세포에서 전반적으로 일어나는 현상인지, 또는 이러한 산화와 재생의 생리학적인 의미가 무엇인지에 대해서는 분명하지 않다. 이에 저자 등은 통념적으로 높은 분압의 산소에 노출되어 있을 것으로 예상되는 Type I 과 Type II 폐상피세포주 (WI 26 와 A549)와 염증반응이나 식작용에 관여하는 과정에서 산화 스트레스에 노출이 빈번하다고 알려진 대식세포주 (Raw 264.7) 이외에 기타 섬유모세포주 (Rat<sub>2</sub> cells), 폐포모세혈관 내피세포주 등에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Prx의 산화 과정과 재생을 알아보려고 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험 대상 폐 조직 및 세포주

실험 대상으로는 환자의 수술시 적출한 정상 폐 조직과, 실험 대상 세포주로서 평상시 산화 스트레스에 노출이 많을 것으로 예상되는 세포들로서, 폐포상피세포의 I형 및 II형 세포 (Type I, II pulmonary epithelial cells)에서 기원한 WI26 세포주와 A549 세포주를 사용하였고, 또 대식세포주 기원의 Raw 264.7 세포주를 이용하였다 (ATCC, Rockville, MD, USA). 이외 세포주로서 HeLa 세포주, 섬유모세포주인 Rat<sub>2</sub> 세포주 (ATCC, Rockville, MD, USA), 제대정맥 내피세포, 및 폐포모세혈관 내피세포의 일차 배양도 이용하여 실험하였다 (Clonetics, Rockville, MD, USA).

배양에 사용한 배지로는 MEM, modified Kahn's medium, DMEM 등 각 세포주 마다 ATCC에서 권장하는 배지와 10% fetal bovine serum을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 농도에서 배양하여 사용하였고, 일차 세포배양의 경우는 Clonetics사에서 권장하는 EGF, VEGF, 및 FGF 등이 포함된 특수배지를 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### A. 1차원 전기영동 분석 (1-Dimensional Non-reducing Electrophoresis)

6 well plate에 배양된 각각의 세포주를 각각의 well 마다, 미리 정한 적정농도의  $H_2O_2$ 에 노출시킨 후 (50  $\mu M$ , 100 $\mu M$ , 500 $\mu M$  및 1mM), 일정 시간의 경과에 맞추어 (0, 10', 30', 45', 60' 및 120' 분) ice cold phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하고, 곧 바로 homogenization buffer (20mM Hepes pH7.0, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 100mM NaCl, 5 $\mu g/ml$  leupeptin, 10 $\mu g/ml$  aprotinin) 300 $\mu l$ 를 넣어 lysis 시킨 후 BCA 법으로 단백 정량하고, 동일한 양의 sample buffer (2 X, non-reducing condition))를 섞은 후 95  $^{\circ}C$ 에서 5분간 가열한다. 이를 각각의 lane 당 10  $\mu g$  씩 loading 한 후, 12% non-reducing SDS PAGE로 전기영동하여 분리하고, nitrocellulose 막에 흡착 이동시켜, 각각의 Prx 동위효소들에 대한 특이 항체로 Western blot을 실행하여 분석하였다. 하지만, Prx 유형 V 와 VI 는 비전형적인 유형으로, S-S 결합하고 있지 않기 때문에 dimer 결합여부를 보는 non-reducing gel 은 시행하지 않고, 통상의 reducing SDS-PAGE 만 시행하였다.

### B. 2차원 전기영동 분석

#### (2-Dimensional Electrophoresis)

100mm 직경의 배양 plate에서 각각의 세포주를 함유되도록 배양한 후, 각각을 미리 정한 농도의  $H_2O_2$ 로 처리한다 (방법 2-A 참조). 이를 다시 미리 정한 시간대에 맞추어 (방법 2-A 참조), ice-cold PBS로 세척한 후 lysis buffer (8M urea, 4%CHAPS, 40mM Tris)와 혼합하여 수확 한다. 얻어진 시료를 Bradford 방법으로 단백 정량 후, 적절한 량의 lysate를 다시 re-hydration buffer (8M urea, 2%CHAPS, 0.5% immobilization pH gradient gel strip (pH3-10, non-linear))에서 isoelectric focusing을 시행한다. Isoelectric focusing 은 IPGPhor isoelectric focusing unit (Amersham Biosciences)을 이용하였으며, 두 번째 분리 과정인 SDS-PAGE 전기영동은 Hoeffer 의 13 cm vertical

slab gel unit을 이용하여 실험하였다. 전기영동 후 nitrocellulose membrane에 이동시켜 각각의 Prx 유형들에 특이한 항체를 이용, Western blot 시행 후 electrochemiluminescence로 발색 후 관찰하였다.

### C. cycloheximide에 관한 단백질 합성억제 효과

인체 세포에 작용하여 단백질 합성을 차단하는 역할을 하는 cycloheximide (10  $\mu g/ml$ )를, 배양된 세포의 배지에 전 처치한 후, (방법 2-A) 와 같은 실험을 하여 이를 일차원 및 이차원전기영동으로 분석하며, 단백질 합성억제로 인하여 Prx 산화 및 재생에 미치는 영향을 관찰하였다.

### D. $H_2O_2$ 에 의한 Prx 단백질의 반복적인 불활성화

Prx 단백질의  $H_2O_2$ 에 의한 불활성화는, 반드시 단백질의 효소의 작용 과정에서 발생하며, 활성을 지닌 cysteine 부위에 한하여 발생한다고 보고 되기 때문에 20, 이를 확인하기 위하여, 방법 2-A와 같은 조건에서, 배양된 세포주를 대상으로  $H_2O_2$  (500  $\mu M$ )을 처리하여, Prx를 불활성화시켜 모두 monomer의 형태로 만들고 난 후, 일정 시간이 경과되어 (약 4시간 후), 다시 재생된 유형으로 전환되면, 다시 동일한 농도의  $H_2O_2$  (500 $\mu M$ )을 가하여 불활성화 여부를 관찰하였다 (Figure 9-A, B).

## 결 과

### 1. 각기 다른 세포주에서 6개의 Prx 동위효소들의 분포

정상 폐조직의 단백질을 추출하여 non-reducing gel 전기영동을 하거나 또는, 통상의 reducing gel 전기영동 후에 각각의 Prx I-III 유형에 대한 항체로 Western blot 을 시행하였을 경우 (Figure 1 과 Figure 2-A, B, C), Prx 단백질들은 정상 폐 조직에서는 거의 전부가, 주로 환원된 상태의 활성 dimer 형태로서 존재하였으며, S-S bond 가 결합되어 있어 2 배의 분자량 (48 kDa)을 갖는 band로 관찰되는 반면에, 세포주에서는 정상 폐조직보다 더 많은 양의 Prx 단백질이 관

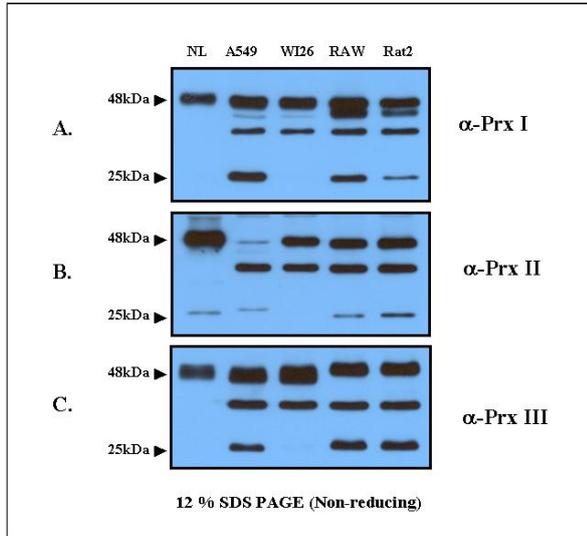


Figure 1. Expression of the oxidized and reduced form of Prx I, II, and III in the normal lung tissue and various cell lines (non-reducing SDS-PAGE).

Normal lung tissue (NL) and various cell lines (A549, WI26, Raw 264.7, and Rat2) were lysed in a homogenization buffer and 10 μg/lane of the total protein extract was loaded onto 12% non-reducing SDS PAGE with subsequent Western blot analysis by Prx isoform specific antibodies (The 48 kDa band represents the reduced form of Prx in its dimeric state, and the 25 kDa band in the bottom represents the monomeric Prx bands along with their active site cysteine in an oxidized state).

찰되었고, 그 중의 많은 부분이 25 kDa 분자량을 갖는 monomeric band로 나타났다 (Figure 1 과 2 의 lanes; NL, A549, WI26, Raw 및 Rat<sub>2</sub>).

폐포의 상피세포들 가운데, type II 상피세포를 대표하는 A549 세포주에서는 Prx I, III, IV, V 및 VI 가 관찰되었으며, 특히 Prx I 유형이 타 세포주들에 비하여 다량으로 발현되어 있었다. 하지만 다른 포유류 세포들에서 공통적으로 관찰되고 효모 또는 인체 적혈구에서 주요 항 산화단백질로 알려진 Prx II 유형은 거의 관찰되지 않았다 (Figure 1-A, B, C 와 Figure 2-A, B).

또한 type I 폐포 상피세포에서 기원한 WI 26 세포주는 과량의 Prx II 를 발현하고 있는 반면에, Prx I 의 발현 양은 상대적으로 적었으며, A549 와 WI26 두 종류 모두 미토콘드리아의 활성과 관련이 있다고 하는 Prx III 를 많은 양 보유하고 있었다. (Figure 1-C, Figure 2-C)

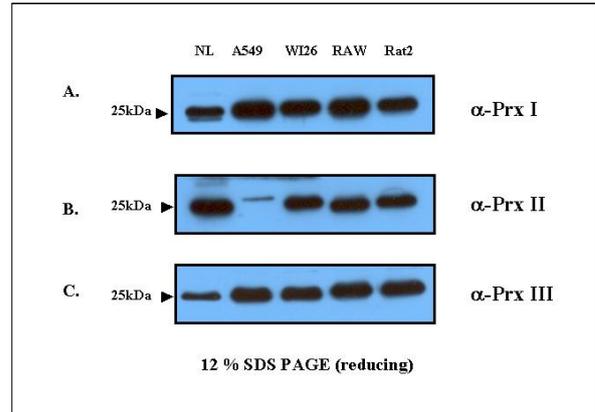


Figure 2. Expression of oxidized form and reduced form of Prx I, II, and III in the normal lung tissue and various cell lines (reducing SDS-PAGE).

The samples were treated in the same way as in the Figure1. However, they were incubated with the sample buffer containing both DTT and β-mercaptoethanol, which reduces the intermolecular disulfide linkage of the Prx proteins.

세균이나 손상된 조직의 식작용, 염증반응에 관여하는 역할 등으로 인해서, 비교적 산화 스트레스를 많이 받을 것으로 예상되는 Raw 264.7 대식세포주에서는, Prx VI 유형을 제외한 모든 유형의 Prx 동위 효소들이 풍부하게 검출되었으며, (Figure 1-3), 섬유모세포, 제대정맥 내피세포, 폐동맥 내피세포, 및 기관지 평활근 등에서도 주로 Prx I, II, III 유형이 고르게 분

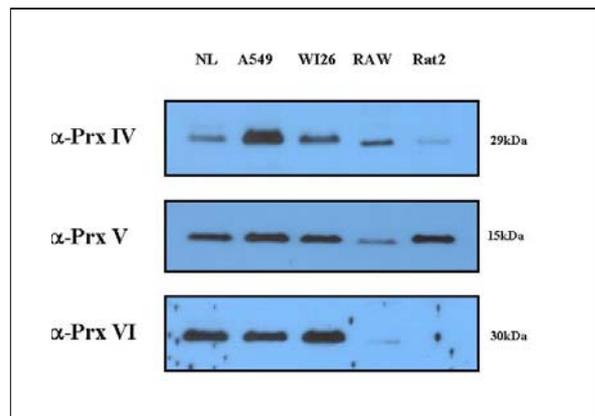


Figure 3. Expression of the oxidized and reduced form of Prx IV, V, and VI in the normal lung tissue and various cell lines (reducing SDS-PAGE).

The samples were prepared in the same way as in the Figure 1 and Figure 2. However, they were electrophoresed under reducing conditions, and subsequent immunoblots were performed with anti-Prx IV, V, and VI specific polyclonal antibodies, respectively.

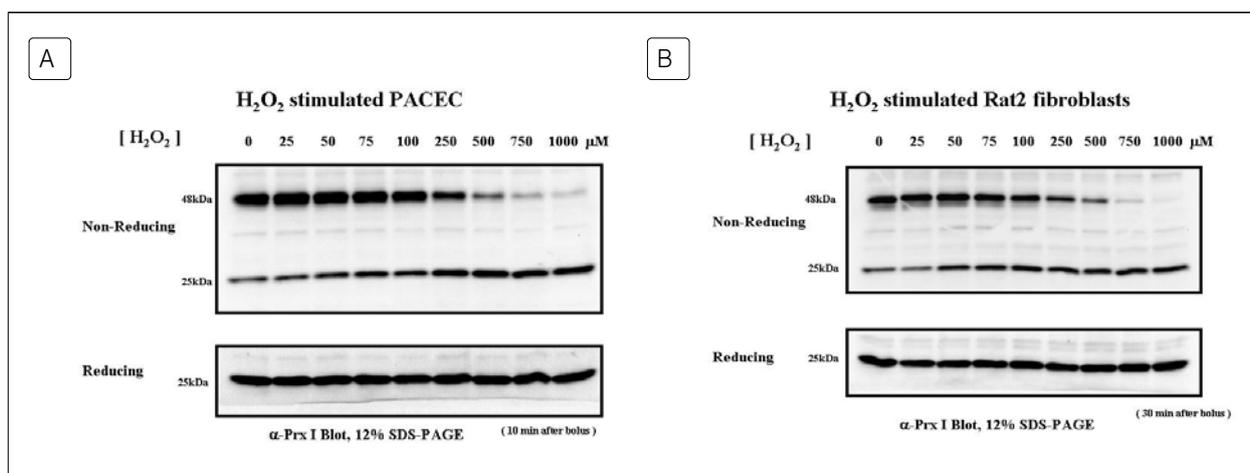


Figure 4. Oxidation of Prx I under varying concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pulmonary capillary endothelial cells and in Rat2 fibroblasts.

Primary cultured pulmonary capillary endothelial cells (PACEC), were plated onto 6 well plates and different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, as indicated, were added. Each well was harvested using a homogenization buffer and Western blotted with anti-Prx I specific antibody after non-reducing SDS-PAGE (A). As the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration increased, Prx I gradually shifted toward the monomeric state (*top panel*). However, the total amount of Prx I observed in the reducing SDS-PAGE is the same (*bottom panel*). In addition, similar results were obtained with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Rat2 fibroblast cell line (Rat2) under varying H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations of (B).

포하고 있었다 (Figure 4 및 저자의 미발표 자료).

## 2. 폐포상피세포주 및 대식세포에서의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Prx 단백질산화

실험에 사용된 세포주 각각은 모두, 비교적 낮은 농

도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>농도인 25-50μM 정도에서부터 Prx dimer의 불활성화를 보여주기 시작하였으며 (Figure 4 & Figure 10), 100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서는 약 50%가 불활성화되었고, 500μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>농도에서는 Prx의 거의 전부가 산화된 형태로 전환되었다 (Figure 4 & Figure 10).

이들 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도 중에서 500μM 농도를 선택하여

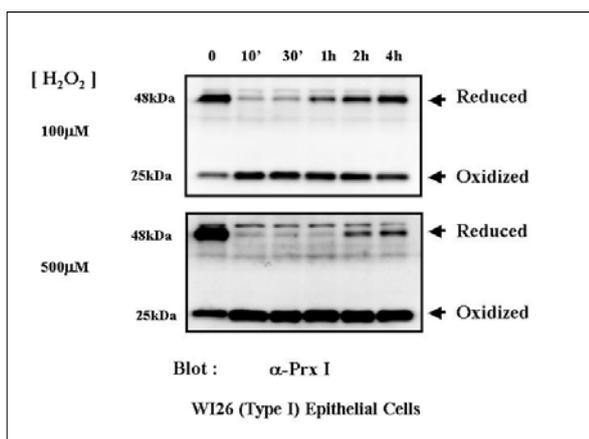


Figure 5. Oxidation and subsequent regeneration of Prx I in WI26, type I pulmonary epithelial cell line.

After oxidizing the Prx I protein in the WI 26 pulmonary epithelial cell line by the addition of 100 and 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the intensity of the monomeric band was observed. The density of the monomeric band decreased and gradually shifted toward the dimeric forms with time.

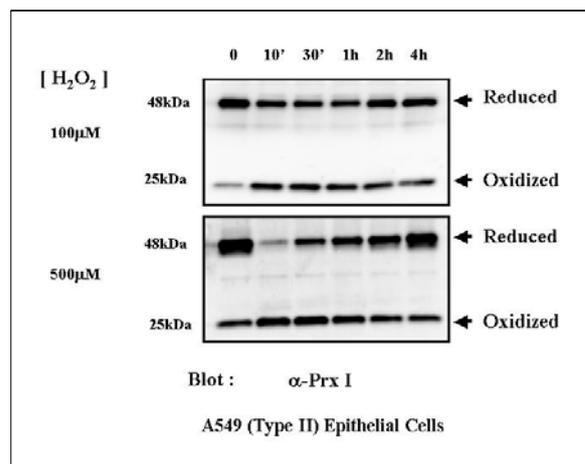


Figure 6. Oxidation and subsequent regeneration of Prx I in A549, type II pulmonary epithelial cell line.

Oxidation of Prx I into the monomeric form was induced by the addition of 100 and 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Subsequent conversion of Prx I into its original dimeric reduced state was observed with increasing time.

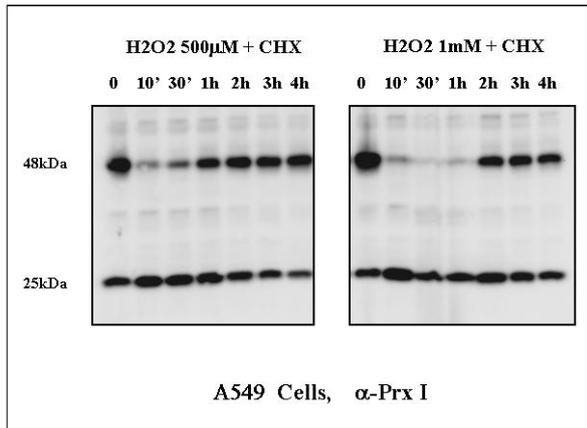


Figure 7. Effect of protein synthesis inhibitor, cycloheximide on oxidation and regeneration of Prx I in A549 pulmonary epithelial cell line.

As described in materials and methods, A549 cells in the 6 well plates were treated with cycloheximide (10 µM) for 30 minutes, prior to the addition of 500 µM (panel A) and 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (panel B), respectively. Even after protein synthesis was blocked, a shifting of the Prx I from its monomeric oxidized state toward the dimeric reduced form occurred, suggesting the recycling of the oxidized protein rather than re-synthesis.

배지에 첨가한 후 관찰하였을 경우, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 반응 후 10 분 이내에, 모든 Prx가 산화되어 불활성의 형태로 존재하였으나, 약 30 분 정도가 경과하면서 점차 48 kDa의 dimeric band로 전환되면서, 25 kDa의 산화된 monomeric band는 dimeric band가 증가한 만큼 점차 감소하는 양상을 보였다 (Figure 5 & Figure 6).

이러한 변화는 A549, Raw 264.7 세포주의 경우, WI 26 세포주에서 보다 더 뚜렷하고 신속하였으며, HeLa, Rat<sub>2</sub> 세포주, HUVEC 폐동맥 모세혈관 내피세포, 및 PACEC 세포 등에서는 상대적으로 속도가 느리게 환원반응이 나타났다 (Figure 4-A & B, 5, 6, 및 미발표 자료).

### 3. 단백질 합성억제제인 Cycloheximide 가 Prx 단백질의 산화와 환원에 미치는 영향

인체 세포에 작용하여 단백질 합성을 억제하는 cycloheximide 10 µg/ml 전 처리 후에 A549 세포주와 WI 26 세포주를 배양하고, 여기에 500µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가한 결과에서도 역시, Prx의 dimer가 산화되어

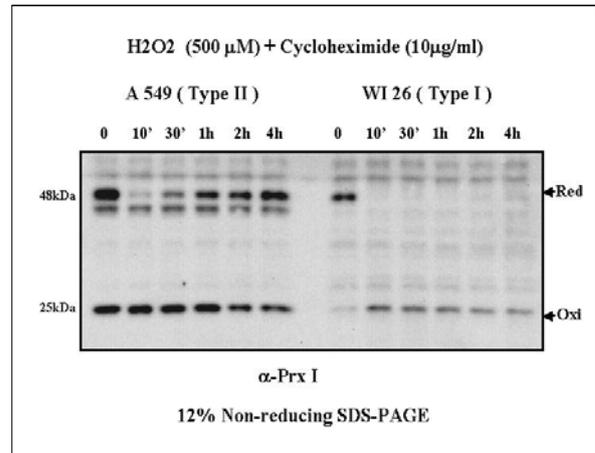


Figure 8. Difference in the rate of regeneration of the oxidized Prx I between A549 and WI26 cells in the presence of cycloheximide.

The rate of regeneration of the oxidized Prx I between A549 and WI26 cells were compared after protein re-synthesis inhibition by cycloheximide. The A549 cells contained more Prx I and the rate of regeneration was faster (panel A), whereas the WI 26 cells had less Prx I and hence were more vulnerable to the same H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (panel B).

monomer의 형태로 불활성화 되었다가, 시간이 경과함에 따라 점차 48 kDa dimeric band로 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서, 단백질 합성이 억제된 상태에서도, Prx 단백질이 다시 dimer의 형태로 회복 되는 기전은, 새로운 *de novo* 합성이 아닌 재생 (recycling 또는 regeneration) 으로 사료되었다 (Figure 7, Figure 8).

### 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Prx 단백질의 반복적 불활성화

Prx 단백질의 산화는, 활성 효소의 작용 과정에서만 일어난다고 보고되기 때문에, 재생된 Prx 단백질이 활성을 띤 형태인지를 확인하기 위하여 Raw 264.7 세포주를 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 처리하였다. 모두 불활성화 시킨 후 약 4시간 경과되어, 다시 완전히 dimer의 형태로 환원되고 난 후, 재차 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 µM)를 처리함으로써, 처음과 동일한 불활성화와 재생 효과를 관찰할 수 있었는데, 이러한 것은 Prx I 과 Prx II 유형 모두에서 공통적으로 관찰할 수 있었다 (Figure 9-A, B).

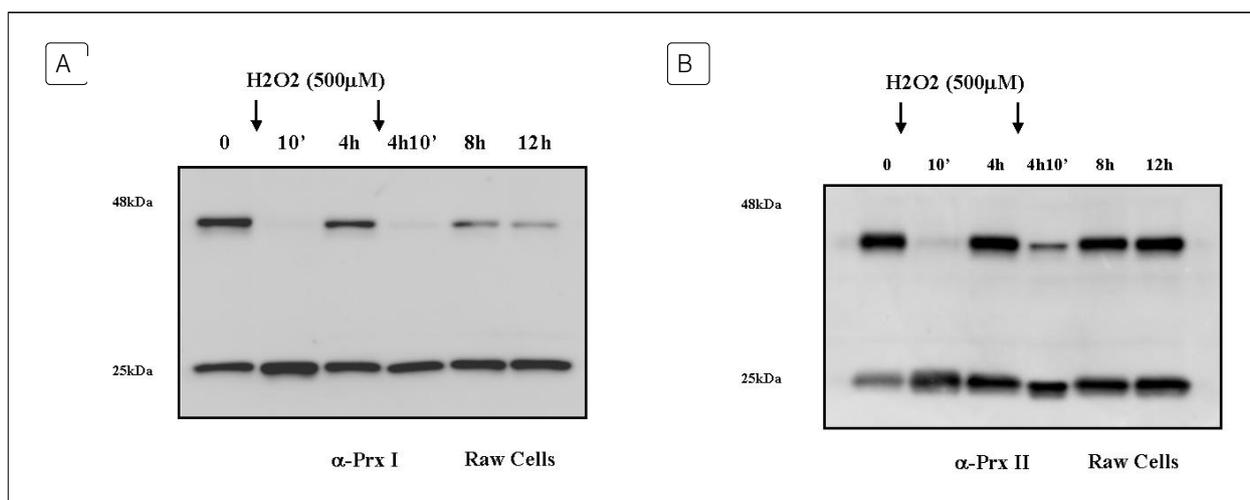


Figure 9. Repeated oxidative inactivation and regeneration of Prx I by  $H_2O_2$  in Raw 264.7 cell line. In order to determine if the regenerated Prx I after  $500 \mu M H_2O_2$  treatment was still catalytically active, repeat oxidation experiments with  $500 \mu M H_2O_2$  was performed. The same inactivation and regeneration sequences demonstrated by the result of the experiment suggested that the regenerated Prx I was indeed catalytically active (Prx I: A, Prx II: B).

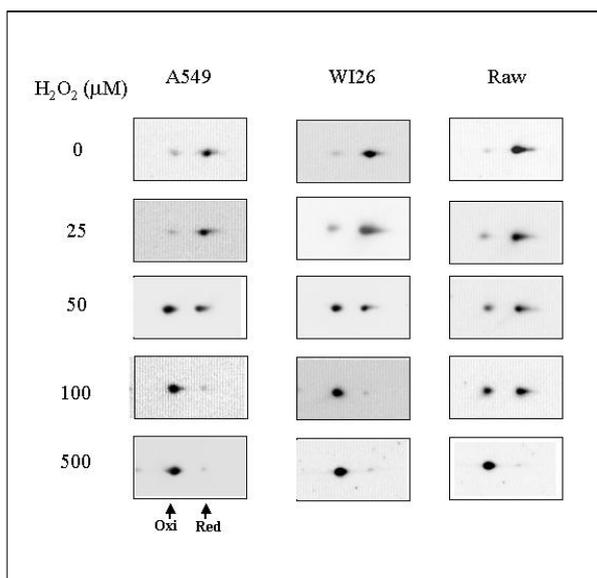


Figure 10. Oxidation of Prx I under different concentrations of  $H_2O_2$  in A549, WI26, and Raw 264.7 cell lines analyzed by 2-dimensional electrophoresis. After exposing cells to the different  $H_2O_2$  concentrations (0, 25, 50, 100, and  $500 \mu M$ ) as described, the cells were harvested and underwent 2-dimensional electrophoresis. The right side of the gel represents the basic proteins with a higher isoelectric point (pI), and the left side indicates the proteins with an acidic pI. pH gradient 3-10, non-linear gel strip was used for the first dimension and 13 cm 12% SDS-PAGE under reducing condition was used for the second dimension (Oxi ; oxidized Prx I. Red : reduced Prx I, Western blot with anti-Prx I antibody).

### 5. $H_2O_2$ 처리에 의한 Prx 단백질의 이차원 전기영동 상에서의 이동성의 변화

각각의 Prx 들은 정상적으로는 환원된 상태로 존재 하지만 산화되면 첨가된 산소 분자에 의하여 isoelectric point (pI)가 변하게 된다. 비교적 분자량이 작기 때문에 이차원 전기영동의 isoelectric focusing 상에서,

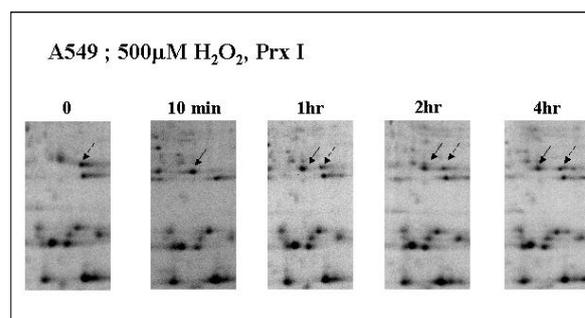


Figure 11. Oxidation and subsequent regeneration of Prx I in the A549 cell line analyzed by 2-dimensional electrophoresis. After treating A549 cells in culture with  $500 \mu M H_2O_2$ , regeneration of Prx I was monitored using silver stained 2-dimensional electrophoresis of the lysates. Immediately after the exposing the cells to  $H_2O_2$  for 10 minutes, all the Prx I protein was observed as the oxidized spot (linear arrow), but the regeneration activity began after one hour converting most of the Prx I into the reduced form (arrow with the broken line) by 2-4 hours.

원래의 환원된 Prx 단백질이 위치하던 것보다 더 산성의 pI를 갖는 위치에 새로운 점으로 보이는 이동성의 변화를 나타내고 (Figure 10 oxi) 시간의 경과에 따라 다시 원래 pI를 갖는 점 (Figure 10 Red)으로 재생되어 합쳐지게 된다 (Figure 11).

## 고 찰

그 동안 산소는 세포나 생물체가 생명을 유지하고, 에너지원을 공급 받는데 없어서는 안될 필수 원소로 알려져 왔다. 하지만 과량의 산소는 이 과정에서 활성산소기를 유출시키고 이러한 불안정성으로 인해 세포의 단백질, 지질막 및 DNA 등이 손상을 입고 노화된다고 알려져 왔다<sup>1, 23</sup>. 따라서, 그 동안 활성산소기에 대하여 주로 조직, 장기, 및 세포에 대한 손상 측면과 이를 막는 방어기전에 대한 연구에만 주력해 왔었다<sup>23</sup>. 하지만, 이러한 활성산소기는 세포의 정상적인 미토콘드리아 내의 호흡과정<sup>24</sup>, 세포막 수용체를 통한 신호전달 과정<sup>1</sup>, 성장인자 자극, 사이토카인 및 염증반응이나 발암과정처럼 아주 다양한 체내 활동 과정에서 항상 발생할 수 있으며<sup>10</sup> superoxide 나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>같은 활성산소기 자체가 세포 내 신호전달 물질로서 역할을 한다는 것이 밝혀지게 되었다<sup>5</sup>.

최근 들어서 면역이나 염증 반응에 관여하는 호중구<sup>5</sup>, 대식세포<sup>12</sup>, 임파구들<sup>25</sup> 이외에도, 섬유모세포<sup>6</sup>, 대장 등의 상피세포<sup>8</sup>, 평활근 세포<sup>7</sup>, 혈관 내피 세포<sup>7</sup>등의 거의 모든 세포가 NAPH oxidase의 일종인 Nox 또는 Mox 계통의 효소를 세포막과 세포질에 갖고 있으며, 이들 활성산소기를 제 2 신호전달 물질로 활용하고 있는 기전이 밝혀짐에 따라, 관련된 분야의 연구가 다방면에서 기하 급수적으로 증가하였으며, 각종 proteomics 기술과 분석 방법의 발달과 더불어, 세포내 신호전달 체계 연구에 획기적인 변화를 가져오고 있다.

단백질의 인산화가 인산화 효소와 탈인산화 효소의 미묘한 균형에 의해 단백질을 covalent modification 시켜서 단백질 효소 스위치를 on-off 하도록 조절하는 것처럼, 활성산소기도 활성 cysteine을 갖는 단백질의 sulfidryl 기 (-SH)를 covalent modification 시켜서 단백질의 기능을 제어하고, 신호전달을 매개할 가능

성이 높다. 이처럼 활성산소기의 대표적인 신호전달 물질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대해 취약한 활성효소부위 cysteine (thiolate anion; S-)을 갖는 대표적인 예로서는 protein tyrosine phasphatase나 세포주기 조절에 관여하는 cyclin-dependent kinase의 탈인산화 효소가 있는데, 이들이 활성산소기에 의해 활성이 억제되면, 성장인자 수용체의 무성요소인 인산화 효소에 의한 tyrosine 인산화가 증가하고, 세포분열이 지속되어, 증식이나 발암의 과정이 일어날 수 있다<sup>12</sup>.

최초로 분리 정제된 peroxiredoxin은 효모 (yeast, *Saccharomyces pombe*) 에서 클론된 25KDa의 단백질로서<sup>17</sup>, 단백질의 N-terminal과 C-terminal에 각각 2개의 보존된 cysteine잔기를 갖고 있으며<sup>18</sup>, thiol-containing 산화시스템에 대한 방어 효과를 보였기 때문에, 보호단백질 또는 thiol-specific antioxidant 로 불렸다가<sup>19</sup>, 추후에 전자 공여자가 thioredoxin인 것이 밝혀지면서 thioredoxin peroxidase로 지칭되었으나<sup>13</sup>, 그 이후에 발견된 thioredoxin peroxidase 중에 일부가 thioredoxin을 전자 공여자로 사용하지 않는다는 것이 규명된 이후부터는 다시 peroxiredoxin이란 명칭으로 불리고 있다<sup>17</sup>. 사람에게서 알려진 Prx는 모두 6개의 동위효소가 밝혀져 있는데, 각각의 분포는 세포와 장기마다 다른 것으로 보고된다<sup>13, 17</sup>. 정상적으로 Prx 는 환원된 상태에서 2개의 homodimer 가 disulfide 결합 (S-S bond) 을 통하여 head-to-tail 형태로 결합된 dimer로서 존재하는데, 산화되게 되면 disulfide 결합을 이룰 수 없게 되어 monomer의 형태로 나누어지게 된다<sup>18</sup>.

Prx 단백질은 모두 6 종류의 동위효소가 밝혀져 있으며, 세포 내에서 산화에 의한 신호전달에 중요한 역할을 할 가능성이 높는데, 그 이유로는 세포 내에 다량이 세포질, 핵, 미토콘드리아, endoplasmic reticulum, 및 과산화소체등 다른 세포내 기관들에 위치하고, 세포의 특성에 따라 분포가 다르며, 세포 내 redox potential을 조절하고, 세균으로부터 사람에게 기르기 까지 공통적으로 보존되어 있다는데 있다<sup>16</sup>.

Prx는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 를 물로 환원시키고 자신은 sulfenic (-SOH)형태로 산화되지만, thioredoxin으로부터 전자를 받아 다시 sulfidryl 형태(-SH)로 환원되고, 산

화된 thioredoxin은 NADPH를 한 분자 소모해 가면서, thioredoxin reductase로부터 전자를 받아 원래의 환원된 형태로 된다<sup>26, 27</sup>.

하지만 Prx 단백질이 과다 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 노출될 경우 직접 sulfenic acid 형태 (-SO<sub>2</sub>H)로 산화되어 불활성화 되는데<sup>20</sup>, 연구자 등은 비교적 빈번하게, 높은 산화 스트레스를 접하게 되는 폐포상피세포나 대식세포 뿐만 아니라 제대혈관 내피세포 (HUVEC), HeLa 세포주, 및 평활근 세포 등 거의 모든 세포주에서 이러한 불활성화가 일어나고, 이에 따른 재생이 일어남을 관찰할 수 있었다<sup>21</sup>.

본 연구에서 같은 폐포상피세포라도 A549 세포주는 Prx I 유형이 많고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 스트레스에 잘 견디며, Prx I의 재생 시간도 상대적으로 빠른 반면, WI 26 type I 세포주는 Prx II유형이 많이 존재하고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 스트레스에 비교적 민감하였고, 불활성화된 Prx II 단백질의 재생에도 A549 세포주나 Raw 264.7 세포주에 비해, 시간이 더 걸리는 것이 흥미롭게 관찰되었다 (Figure 8). 이러한 내용은 급성 폐손상시에 type I 상피세포가 type II 상피세포에 비해 손상에 취약하고, 재생 및 복구가 안 되는 점과 유사하며<sup>28</sup> 또한, RBC가 적혈구 모세포로부터 더 분화될수록 Prx II 유형이 많아지는 것에도 일치하는 결과라고 하겠다<sup>29</sup>. 즉 세포가 분화할수록 Prx II가 많아진다는 것인데, 이러한 결과는 실험쥐에서 폐조직 분화과정에서 Prx I과 Prx II의 균형에 의해 폐포상피세포가 분화한다는 보고<sup>30</sup>와 맥락을 같이한다.

각종 인체 질환에서의 Prx 단백질의 변화와 역할에 대해서는 아직까지는 부분적인 보고만이 있을 뿐이고 병태생리학적 의미에 대해서는 연구가 미흡한 편이다. 예를 들면, 유방암<sup>31</sup>과 폐암<sup>32</sup>에서 Prx I 또는 Prx II 단백질의 발현이 증가가 보고되고, Prx V가 인대의 신전 손상과 관련되어 과 발현된다는 보고되고<sup>33</sup>, 유육종증 환자의 육아종에서 Prx III 및 IV의 증가<sup>34</sup> 및 악성 중피세포종 환자에서 Prx II, III의 과발현이 보고되나<sup>35</sup> 구체적인 병리학적 기전에 대해서는 아직 자세히 모르고 있다. 또한 Prx II를 Knock-out 한 mouse 모델에서도 용혈성 빈혈을 유도하여<sup>36</sup>, 간 및 비장종대를 가져오고, 가슴샘세포의 발달을 저해하며<sup>37</sup>, 적혈

구 조혈 모세포의 분화의 장애<sup>29</sup>를 관찰하기는 하였으나, 역시 구체적인 분자생물학적 기전은 알려지지 않고 있다.

본 실험에서 관찰한 것처럼, Prx 단백질은 비록 세포의 종류에 따라 차이는 있지만, 거의 공통적으로 모든 세포에서 산화스트레스 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의해 산화된 후 다시 재생되는 과정을 보여주고 있다. 이러한 점은 이들 Prx 단백질이 그들의 활성부위 cysteine기의 covalent modification에 의해서 세포내 신호전달 과정에서 분자 스위치 역할을 할 가능성을 시사해 주고 있다. 특히, 이러한 현상이 HUVEC, 폐동맥 내피세포, 폐포 모세혈관세포, 및 기관지 평활근 세포 등에서도 동일하게 나타나는 것을 보면 (Figure 5 & Figure 6) 급성 폐손상이나 기도염증반응 때 Prx 단백질의 산화가 일어나, 모세혈관 누출 또는 기관지 수축 등을 유발할 가능성에 대해서도 추후 연구가 필요하다고 본다.

이밖에도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 단백질질의 covalent modification을 통해 세포 내 신호전달에 관여하는 것으로, 잘 알려져 있는데<sup>10</sup> TGF-β의 신호전달이나<sup>38</sup>, Ras에 의한 세포주기 진행과정 및 Fas-ligand에 의한 세포 사멸에도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 주요한 역할을 담당한다고 보고된다<sup>23</sup>. 이 보고들<sup>10, 23, 38</sup>에 따르면, 비록 본 연구에서 관찰한 것이 호중구가 아닌 대식 세포이긴 하지만, ARDS 환자에서 나타나는 호중구의 지속적인 호중구성 폐포염에서 관찰되는 PI Kinase 활성화 및 Akt 활성화와 NF-kappaB 활성화에 있어 Prx 단백질이 관여할 가능성이 있으며, 실제로 저자 등은 ARDS 환자의 기관지폐포세척액내에서 Prx II의 증가를 관찰하였다 (저자 미발표 자료). 또한, 산화 스트레스와 염증 반응으로 인한 폐 상피 손상 후에 회복과정에서의 섬유화로 이어지는 특발성 폐섬유화증 (idiopathic pulmonary fibrosis)의 경우 TGF-β 신호전달과 밀접하게 연관되어 있으므로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 조절되는 TGF-β 신호전달과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 조절하는 Prx 단백질이 특발성 폐섬유화증의 발병과정에서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

또한 최근 발표된 문헌에 보면 ovalbumin sensitive 쥐의 천식모델에서, YM2 및 cathepsin S 등의 염증 반응과 관련된 단백질에 더불어 Prx I의 상당한 증가

가 보고되는데<sup>39</sup>, 이는 호흡기계의 과민성 반응이나 염증반응에 활성산소가 기여하고 있다는 증거가 되며, Prx 단백질이 이 과정에 중요한 역할을 담당함을 보여주는 것이라 하겠다. 하지만, 이미 기존에 많이 연구되고 잘 알려진 catalase 나 glutathione peroxidase 에 비해 Prx 단백질은 비교적 생소하고, 연구도 미흡하며, 더욱이 질병과의 인과 관계는 더 명확하지 않다. 그러나, Aron Fisher 등이 주장하는 것처럼 폐에서 Prx VI 가 주요 항산화제이고 Prx VI 가 성숙과정과 분화과정을 조절하는데 필수라고 하면<sup>40</sup>, 향후에 이들 Prx 단백질과 호흡기 질환과의 관계에 관한 연구가 의미 있을 것으로 사료된다.

미생물, 효모, 및 기생충에서 모두 Prx 단백질은 공통적으로 잘 보존되어 있는데<sup>13</sup>, 이것은 Prx 단백질이 미생물을 산화 스트레스로부터 보호하고, 숙주 내에서 가해지는 면역기전에 대항하여 생존하는데 있어 필수적인 단백질 효소이기 때문이다<sup>14</sup>. 특히 폐질환과 밀접한 결핵균의 경우 Prx 단백질의 일종인 alkylhydroperoxide reductase C(AhpC)를 갖고 있어, AhpF로부터 전자를 받아 peroxidase 효소로 작용을 하고, 대식세포내의 용해소체내에서 살아남을 수 있도록 하며<sup>41</sup>, 이런 AhpC 는 살모넬라<sup>41</sup> Leishmania<sup>42</sup> 및 Falciparum malaria<sup>43</sup> 의 병원성 미생물에도 잘 보존되어 있다.

더욱이, 다제내성 결핵균의 경우는 Isoniazid에 내성을 보이려면 Kat G가 불활성화 되어 catalase 가 역할을 하지 못하게 되는데<sup>44</sup> 이때 Oxy R에 의해 AhpC가 과발현되어 주요한 항산화기전으로서 작용하므로, 다제내성 결핵균을 치유하기 위해서 불활성화된 AhpC를 다시 환원시켜주는 AhpD를 억제하는 물질을 사용하려는 시도가 진행되고 있다<sup>45</sup>.

이처럼, 인체의 산소 교환을 담당하고, 모든 염증반응을 여과하고, 각종의 사이토카인을 제독하는 기능을 하는 사람의 폐는 항상 높은 산화 스트레스를 받고 있기 때문에 Prx 단백질과 호흡기 질환의 병태생리와는 밀접한 관계를 갖고 있다고 하겠다.

결론적으로, 본 연구는 폐를 구성하고 있는 상피세포, 대식세포, 평활근 세포, 섬유모세포 및 혈관 내피세포들에 존재하는 Prx 동위효소들의 유형을 조사하여 기초 자료를 얻고, 이들이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 라는 활성 산소기

(산화 스트레스 또는 염증 반응)에 대한 반응양상과 그 재생과정을 살펴봄으로써 향후 Prx 단백질과 각종 호흡기 질환의 병인과의 연관 관계를 규명하는데 있어 도움이 되고자 하며 Prx 단백질의 활성부위 cysteine 산화가 각종 질환에서 분자 스위치 역할을 어떻게 하는가에 대하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

### 배 경 :

peroxiredoxins는 거의 모든 생명체에 공통적으로 보존되어 있으며, 최근에 발견된, 특이한 peroxidases 로 인체에서 6가지 동위효소가 알려져 있으며, 산화 스트레스에 대한 방어역할을 담당하고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 신호 전달 과정에서 중요한 조절 역할을 한다. peroxiredoxin은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 과정 중에서 자신이 산화되어 불활성화 되는데, 산화된 후 다시 재생되는 것으로 보고되나 그 생리적인 의미는 분명하지 않다. 이에 저자들을 폐상 피세포주, 대식세포주, 폐포모세혈관 내피세포주 및 기타 섬유모세포주 등에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 에 의한 Prx의 산화 과정과 재생을 알아보려고 하였다.

### 방 법 :

수술 환자에서 적출한 정상 폐조직과, 세포주로는 평상시 산화 스트레스에 노출이 많을 것으로 예상되는 세포들으로써, 폐포상피세포의 I 형 및 II 형 세포에서 기원한 A549, WI 26, Raw 264.7, Rat<sub>2</sub> 및 폐포 모세혈관 내피세포주 등을 이용하여 이를 50 μM, 100 μM, 500 μM 의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화시켜 불활성화 한 후, 추적관찰 하였으며, 시간대 별로(0, 10, 30, 60, 120, 240, 480 분) 수확하여, 이를 1차원 non-reducing SDS-PAGE 및 2차원 전기영동로 분리 후, silver stain 과 Western blot으로 분석 하였다.

### 결 과 :

1. 실험에 사용된 모든 세포주에서, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도에 비례하여 peroxiredoxin I, II, III 의 불활성화를 관찰할 수 있었고, 10분에 최고로 불활성화되었다.
2. 산화된 이후, 30분경부터 peroxiredoxin 의 재생이 관찰되기 시작 하였으며, 2시간 이후부터 확인하였다.

3. 다시 재생된 peroxiredoxin은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>투여로서, 다시 불활성화되어, 재생된 Prx 가 활성을 지닌 단백질임을 알 수 있었다.

4. 재생의 속도는 사용된 세포주마다 차이가 있었으며 (A549 >Raw 264.7 >Rat<sub>2</sub> >WI26), 단백질 합성억제제인 cycloheximide (10μg/ml) 존재 하에서도 변함없이 관찰되었다.

#### 결 론 :

세포 내에는 산화되어 불활성화된 peroxiredoxin을 재생하는 체계가 존재 하며, 이는 활성부위 cysteine을 갖는 다른 단백질에도 공통적으로 적용될 수 있는 분자 스위치일 가능성이 높으며, 산화에 의한 신호전달과정이나, 질병 모델에서 Prx 단백질의 재생 체계의 이상과 병인에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

#### 참 고 문 헌

- Lavrovsky Y, Chatterjee B, Clark RA, Roy AK. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age related diseases. *Exp Gerontol* 2000;35:521-32.
- Abraham E. Nuclear factor-kappaB and its role in sepsis-associated organ failure. *J Infect Dis* 2003; 187(Suppl 2):S364-9.
- Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 2000;165:2950-4.
- Abraham E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage-or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L1137-45.
- Jones RD, Hancock JT, Morice AH. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? *Free Radic Biol Med* 2000;29:416-24.
- Dhaunsi GS, Paintlia MK, Kaur J, Turner RB. NADPH oxidase in human lung fibroblasts. *J Biomed Sci* 2004;11:617-22.
- Marshall C, Mamary AJ, Verhoeven AJ, Marshall BE. Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:633-44.
- Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* 2004;90:491-3.
- Stone JR. An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. *Arch Biochem Biophys* 2004;422:119-24.
- Rhee SG, Chang TS, Bae YS, Lee SR, Kang SW. Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:S211-5.
- Kaushal GP, Liu L, Kaushal V, Hong X, Melnyk O, Seth R, et al. Regulation of caspase-3 and -9 activation in oxidant stress to RTE by forkhead transcription factors, Bcl-2 proteins and MAP kinases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F1258-68.
- Forman HJ, Torres M. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* 2001;22:189-216.
- Chae HZ, Kim HJ, Kang SW, Rhee SG. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract* 1999;45:101-12.
- Chae HZ, Kim IH, Kim K, Rhee SG. Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1993; 268:16815-21.
- Chae HZ, Rhee SG. A thiol-specific antioxidant and sequence homology to various proteins of unknown function. *Biofactors* 1994;4:177-80.
- Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L. Peroxiredoxins. *Biol Chem* 2002;383:347-64.
- Chae HZ, Kang SW, Rhee SG. Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol* 1999;300:219-26.
- Chae HZ, Uhm TB, Rhee SG. Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7022-6.
- Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7017-21.
- Yang KS, Kang SW, Woo HA, Hwang SC, Chae HZ, Kim K, et al. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine sulfinic acid. *J Biol Chem* 2002;277:38029-36.
- Woo HA, Kang SW, Kim HK, Yang KS, Chae HZ, Rhee SG. Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid: immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence. *J Biol Chem* 2003;278:47361-4.
- Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, Yang KS, Kang SW, Kim K, et al. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* 2003;300:653-6.

23. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-47.
24. Chang TS, Cho CS, Park S, Yu S, Kang SW, Rhee SG. Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. *J Biol Chem* 2004;278:41975-84.
25. Cemerski S, van Meerwijk JP, Romagnoli P. Oxidative-stress-induced T lymphocyte hyporesponsiveness is caused by structural modification rather than proteasomal degradation of crucial TCR signaling molecules. *Eur J Immunol* 2003;33:2178-85.
26. Rhee SG, Kang SW, Netto LE, Seo MS, Stadtman ER. A family of novel peroxidases, peroxiredoxins. *Biofactors* 1999;10:207-9.
27. Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 2001;52:35-41.
28. Hermanns MI, Unger RE, Kehe K, Peters K, Kirkpatrick CJ. Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro. *Lab Invest* 2004;84:736-52.
29. Rabilloud T, Berthier R, Vincon M, Ferbus D, Goubin G, Lawrence JJ. Early events in erythroid differentiation: accumulation of the acidic peroxidoxin (PRP/TSA/NKEF-B). *Biochem J* 1995;312:699-705.
30. Kim HS, Kang SW, Rhee SG, Clerch LB. Rat lung peroxiredoxins I and II are differentially regulated during development and by hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L1212-7.
31. Noh DY, Ahn SJ, Lee RA, Kim SW, Park IA, Chae HZ. Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. *Anticancer Res* 2001;21:2085-90.
32. Kim HJ, Chae HZ, Kim YJ, Kim YH, Hwang TS, Park EM, et al. Preferential elevation of Prx I and Trx expression in lung cancer cells following hypoxia and in human lung cancer tissues. *Cell Biol Toxicol* 2003;19:285-98.
33. Wang MX, Wei A, Yuan J, Clippe A, Bernard A, Knoops B, et al. Antioxidant enzyme peroxiredoxin 5 is upregulated in degenerative human tendon. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:667-73.
34. Kinnula VL, Lehtonen S, Kaarteenaho-Wiik R, Lakari E, Paakko P, Kang SW, et al. Cell specific expression of peroxiredoxins in human lung and pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 2002;57:157-64.
35. Kinnula VL, Lehtonen S, Sormunen R, Kaarteenaho-Wiik R, Kang SW, Rhee SG, et al. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *J Pathol* 2002;196:316-23.
36. Lee TH, Kim SU, Yu SL, Kim SH, Park do S, Moon HB, et al. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood* 2003;101:5033-8.
37. Moon EY, Han YH, Lee DS, Han YM, Yu DY. Reactive oxygen species induced by the deletion of peroxiredoxin II (PrxII) increases the number of thymocytes resulting in the enlargement of PrxII-null thymus. *Eur J Immunol* 2004;34:2119-28.
38. Jiang Z, Seo JY, Ha H, Lee EA, Kim YS, Han DC, et al. Reactive oxygen species mediate TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 upregulation in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:961-6.
39. Fajardo I, Svensson L, Bucht A, Pejler G. Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:477-84.
40. Dierick JF, Wenders F, Chainiaux F, Remacle J, Fisher AB, Toussaint O. Retrovirally mediated overexpression of peroxiredoxin VI increases the survival of WI-38 human diploid fibroblasts exposed to cytotoxic doses of tert-butylhydroperoxide and UVB. *Biogerontology* 2003;4:125-31.
41. Niimura Y, Poole LB, Massey V. Amphibacillus xylanus NADH oxidase and Salmonella typhimurium alkylhydroperoxide reductase flavoprotein components show extremely high scavenging activity for both alkyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in the presence of S. typhimurium alkylhydroperoxide reductase 22-kDa protein component. *J Biol Chem* 1995;270:25645-50.
42. Barr SD, Gedamu L. Role of peroxidoxins in Leishmania chagasi survival: evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. *J Biol Chem* 2003;278:10816-23.
43. Kawazu S, Tsuji N, Hatabu T, Kawai S, Matsumoto Y, Kano S. Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin from the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* 2000;109:165-9.
44. Paca-uccaralertkun S, Chuchottaworn C. Kat G mutations in isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Thai patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997;28:387-90.
45. Koshkin A, Zhou XT, Kraus CN, Brenner JM, Bandyopadhyay P, Kuntz ID, et al. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis AhpD, an element of the peroxiredoxin defense against oxidative stress. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2424-30.