

Received: 2013.07.16
Accepted: 2014.09.02
Published: 2015.05.23

Kiedy obrona staje się niebezpieczna – czynnik transkrypcyjny Nrf2 a nowotwory

When defense becomes dangerous – transcription factor Nrf2 and cancer

Adam Krysztofiak, Violetta Krajka-Kuźniak

Katedra Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Czynnik transkrypcyjny Nrf2 kontroluje ekspresję genów kodujących enzymy i białka cytoprotekcyjne. Jego aktywacja jest związana ze zmianami konformacyjnymi w białku inhibitorowym Keap1 i/lub fosforylacją z udziałem kinaz. Aktywacja czynnika Nrf2 może prowadzić do indukcji enzymów II fazy odpowiedzialnych za inaktywację potencjalnych kancerogenów i jest istotną strategią w chemioprewencji. Układy enzymatyczne uczestnicząc w biotransformacji leków mogą obniżyć ich działanie terapeutyczne przyczyniając się do lekooporności. Z tego powodu dokładne poznanie roli czynnika Nrf2 jest konieczne do oceny jego korzystnych i negatywnych działań, zwłaszcza w odniesieniu do profilaktyki i terapii nowotworów.

Słowa kluczowe: Nrf2 • Keap1 • stres oksydacyjny • enzymy II fazy • chemioprewencja • nowotwory

Summary

The transcription factor Nrf2 controls the expression of genes encoding cytoprotective enzymes and proteins. Its activation is related to conformational changes in the inhibitory protein Keap1 and/or Nrf2 phosphorylation by upstream kinases. Activation of Nrf2 can lead to the induction of phase II enzymes responsible for the inactivation of potential carcinogens. This may constitute an important strategy of chemoprevention. Moreover, these enzymatic systems participating in the biotransformation of drugs can reduce their therapeutic effects, contributing to drug resistance. For this reason, a clear understanding of the role of Nrf2 is essential to assess the beneficial and adverse effects of its up-regulation, particularly in relation to the prevention and treatment of cancer. This article summarizes the current state of knowledge on the significance of Nrf2 in tumorigenesis.

Keywords: Nrf2 • Keap1 oxidative stress • phase II enzymes • chemoprevention • cancers

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1137500>

Word count: 5017
Tables: 1
Figures: 3
References: 109

Adres autorki: dr hab. n. farm. Violetta Krajka-Kuźniak, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Katedra Biochemii Farmaceutycznej, ul. Świącickiego 4, 60-781 Poznań, e-mail: vkrajka@ump.edu.pl



Wykaz skrótów:

ARE – element odpowiedzi antyoksydacyjnej; **bZip** – motyw zamka leucynowego; **CK2** – kinaza kazeinowa 2; **Cul3** – kullina 3; **GSK 3β** – kinaza syntazy glikogenowej 3β; **GST** – S-transferaza glutationowa; **γ-GCS** – syntetaza γ-glutamylcysteinowa; **HO-1** – oksygenaza hemowa 1; **HSP90** – białko szoku cieplnego; **Keap1** – białko sensorowe/białko wiążące Nrf2; **MAPK** – kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny; **Nrf2** – czynnik jądrowy 2; **MDR** – komórkowa oporność wielolekowa; **NQO1** – reduktaza NAD(P)H:chinon 1; **PERK** – kinaza białkowa umiejscowiona w siateczce śródplazmatycznej; **PI3K** – kinaza fosfatydyloinozytolu; **PKC** – kinaza białkowa C; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **tBHQ** – tert-butylohydroksychinon.

WPROWADZENIE

Czynnik transkrypcyjny Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), kontroluje ekspresję wielu genów, których produkty działają cytoprotekcyjnie. Są to m.in. geny zawierające w swych promotorach sekwencję ARE (element odpowiedzi antyoksydacyjnej), kodujące takie enzymy jak S-transferaza glutationowa (GST), reduktaza NAD(P)H:chinon 1 (NQO1), oksygenaza hemowa 1 (HO-1) i syntetaza γ-glutamylcysteinowa (γ-GCS) [13]. Aktywację czynnika Nrf2 wywołują czynniki prooksydacyjne, przede wszystkim reaktywne formy tlenu (RFT), a także związki o właściwościach elektrofilowych, najczęściej reaktywne metabolity chemicznych kancerogenów. Z tego względu zwiększona ekspresja Nrf2, to istotny element strategii chemioprewencyjnej nowotworów. Jednak układy enzymatyczne uczestnicząc w biotransformacji leków, mogą obniżyć ich działanie terapeutyczne przyczyniając się do lekooporności [99].

W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat mechanizmów aktywacji Nrf2 i indukcji enzymów II fazy zwracając szczególną uwagę na następstwa tych zjawisk w profilaktyce i terapii nowotworów

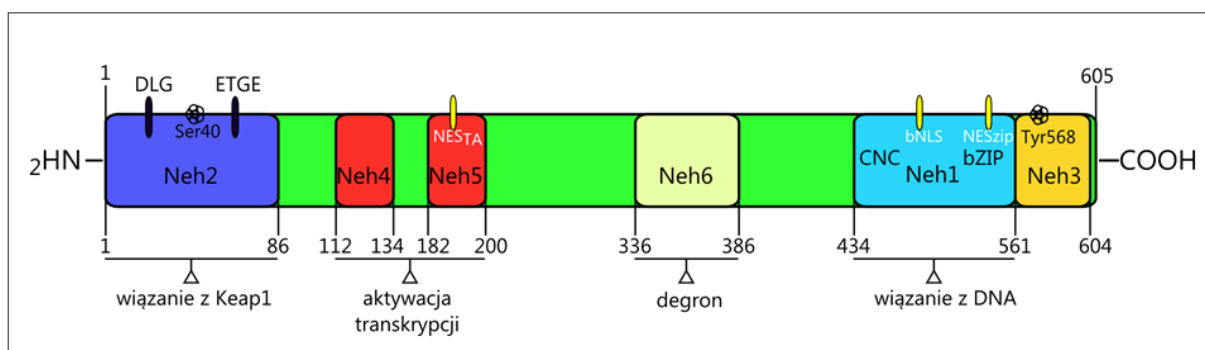
STRUKTURA BIAŁKA NRF2

Nazwa czynnika Nrf2 jest związana z badaniami prowadzonymi nad ekspresją genów α- i β-globiny w dojrzewających erytrocytach. Strukturę ludzkiego czynnika transkrypcyjnego Nrf2 określono w 1993 r., wyizolowano wówczas cDNA ludzkiego homologa mysiego białka nuclear factor-erythroid 2-NF-E2 [6]. Białko Nrf2 wyizolował rok później zespół Moi i wsp., który wykorzystując tandemowe powtór-

zenia rozpoznające sekwencje NF-E2 w bibliotece cDNA λgt11 z linii komórek K562, otrzymali kilka białek wiążących się z DNA. Jednym z otrzymanych białek był Nrf2, który w przeciwieństwie do NF-E2, ulega stałej ekspresji w większości komórek [62].

Nrf2 należy do rodziny białek zawierających w strukturze motyw zamka leucynowego (bZip). Ludzki Nrf2 zawiera 605 aminokwasów i należy do podrodziny białek „cap n’ collar” (CNC), zawierającej także bliźniacze czynniki NF-E2, Nrf1 oraz Nrf3 [19]. Wszystkie białka wchodzące w skład tej podrodziny charakteryzują się wysoce konserwatywną sekwencją, składającą się z 43 aminokwasów, a położoną blisko N-końca domeny odpowiedzialnej za wiązanie się z DNA, czyli tuż przed regionem zamka leucynowego [4]. Chan i wsp. wykazali, że u myszy pozbawionych *nrf1*^(-/-) występowała ciężka anemia i śmierć *in utero*, co sugeruje, że czynnik ten jest niezbędny do prawidłowego rozwoju komórek, zwłaszcza erytrocytów [7]. Natomiast myszy *nrf2*^(-/-) są zdolne do prawidłowego funkcjonowania, rozmnażania i nie zaobserwowano u nich anemii, co potwierdza, iż czynnik Nrf2 nie jest niezbędny do erytropoezy, wzrostu czy rozwoju [8]. W strukturze czynnika Nrf2 można wyróżnić kilka konserwatywnych domen: Neh1-Neh6 (ryc.1) [24]. Domena Neh1 zawiera region CNC oraz domenę zamka leucynowego (bZip), domena Neh2 jest N-końcową, natomiast Neh3 to C-końcowa domena. Kolejne dwie domeny Neh4 i Neh5 są to regiony kwaśne, a Neh6 to region bogaty w serynę.

Każdy z wyżej wymienionych elementów strukturalnych czynnika Nrf2 spełnia odrębne zadania. Domena Neh1 odpowiada za wiązanie DNA i dimeryzację z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, takimi jak białka Maf. Domena



Ryc. 1. Struktura białka Nrf2

Neh2 umożliwia interakcje z represorem – Keap1 [25]. Natomiast domena Neh3 działa jako domena transkryptywna, może też oddziaływać z elementami aparatu transkrypcyjnego i wpływać na aktywność Nrf2 [66]. Domeny Neh4 i Neh5 biorą udział w aktywacji czynnika Nrf2 [34]. Ostatni z zidentyfikowanych dotąd regionów to Neh6, który wraz z Neh2, nazywany jest degronem. Degrony to swoiste sekwencje aminokwasów, które odpowiadają za degradację czynnika Nrf2. Domena Neh6 w przeciwieństwie do Neh2 nie jest podatna na zmiany potencjału redoks [60]. Właściwości strukturalne Nrf2, mają odzwierciedlenie w funkcji jaką pełni w komórkach, o której będzie mowa w następnym podrozdziale.

MECHANIZMY AKTYWACJI I REGULACJI FUNKCJI CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO Nrf2

Ochrona przed stresem oksydacyjnym zależy od sprawnego systemu reagowania na zmiany poziomu RFT i aktywności enzymów antyoksydacyjnych, których ekspresja jest pod kontrolą m.in. czynnika Nrf2. W związku z zaburzeniem potencjału oksydo-redukcyjnego komórki, Nrf2 ulega aktywacji zwiększając transkrypcję genów kodujących m.in. enzymy II fazy i enzymy antyoksydacyjne, po uprzednim związaniu się z sekwencją ARE. Pierwsze doniesienia o istnieniu sekwencji modulującej transkrypcję tych genów, pochodzą z pracy Prochaska i wsp., którzy zaproponowali wspólny mechanizm aktywacji dla genów kodujących enzymy I i II fazy pod wpływem ksenobiotyków [70]. Następnie zidentyfikowano sekwencję nukleotydową ARE jako 5'-TGACnnnGC-3', gdzie 'n' oznacza dowolny nukleotyd. Sekwencję opisano podczas badań nad 5'-regionem genu podjednostki *Ya S-transferazy glutationowej* u szczura na podstawie analizy mutacyjnej [72]. Tego rodzaju sekwencje w kolejnych latach stwierdzono w wielu genach kodujących m.in. enzymy detoksykacyjne.

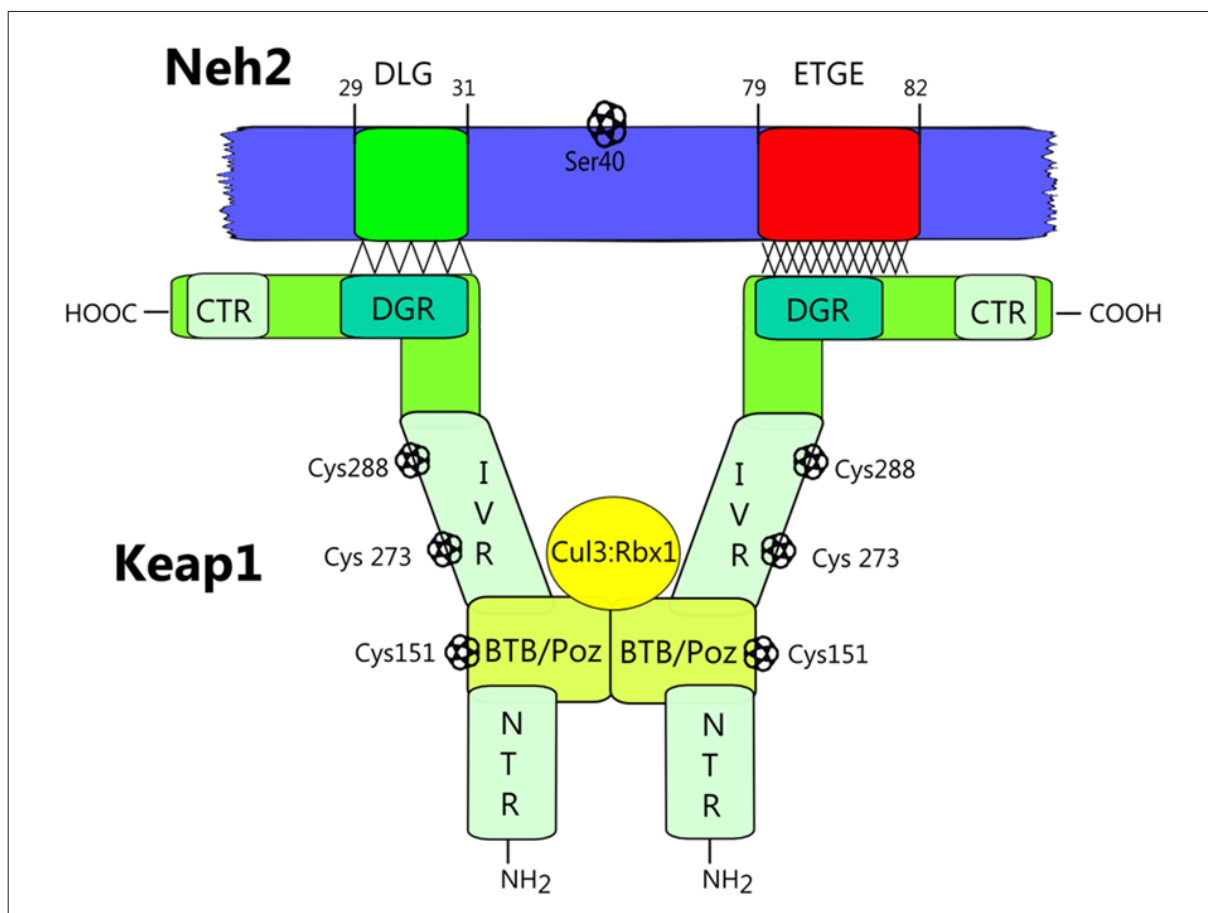
AKTYWACJA Nrf2 Z UDZIAŁEM KEAP1

Transkrypcja genów będących pod kontrolą ścieżki Nrf2-ARE, zależy od wielu czynników, które wpływają na aktywację Nrf2 [59]. Jednym z takich czynników jest białko Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), znane jako inhibitor Nrf2 (INrf2). Jest to metaloproteina, z domeną palca cynkowego, która łącznie zawiera 624 aminokwasy [1]. Białko to jest związane z cytoszkieletem i podobne jest do białek wiążących aktyne, po raz pierwszy odkrytych u gatunku *Drosophila* [25,102]. Białko Keap1 jest podzielone na 5 domen, takich jak domena Kelch inaczej zwana regionem powtórzeń di-glicyny (double-glycine repeat – DGR), region N-końcowy (NTR), domena BTB/POZ (Bric-a-brac, tramrac, broad complex/poxvirus zinc finger), interwencyjny region bogaty w cysteinę (cysteine-rich intervening region – IVR) oraz domena C-końcowa (CTR), przedstawione na ryc. 2 [87,93]. Każda z wymienionych domen jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania ścieżki sygnalizacyjnej Nrf2. Domena BTB/POZ odpowiada za tworzenie dimerów Keap1, prowadząc do sekwestracji Nrf2 w cytoplazmie. Potwierdziły to badania Zipper i Mulcahy, którzy wykazali, iż mutacja reszty seryny w pozy-

cji 104 w domenie BTB/POZ uniemożliwiła dimeryzację Keap1 [87,109]. Białko Keap1 w postaci homodimeru nie może skutecznie wiązać Nrf2, co powoduje uwolnienie tego czynnika z kompleksu, wzrost jego stabilności oraz translokację do jądra komórkowego [108]. Region DGR/Kelch umożliwia natomiast interakcję Keap1 z cytoszkieletem, a także z czynnikiem Nrf2, za pomocą jego domeny N-końcowej – Neh2 [25,93]. Domena Neh2 ludzkiego białka Nrf2 zawiera dwa, wysoce konserwatywne motywy – DLG oraz ETGE. Do motywu DLG należą aminokwasy od 29 do 31, przy czym główną rolę spełnia sekwencja Asp-Leu-Gly [33,55]. Drugi motyw, ETGE zawiera aminokwasy od 79 do 82 z charakterystyczną sekwencją Glu-Thr-Gly-Glu [41,90]. To właśnie te ugrupowania umożliwiają połączenie Nrf2 z Keap1. Zarówno motywy DLG, jak i ETGE białka Nrf2 wiążą się z dwoma identycznymi regionami DGR/Kelch homodimeru Keap1. Wiązanie to jest prawie 100 razy silniejsze w przypadku motywu ETGE niż DLG [90]. Tong i wsp. zaproponowali tzw. „model zawiasu i zatrzaśku” (hinge and latch mechanism) do scharakteryzowania tego wzajemnego oddziaływania [91]. Autorzy założyli, iż w warunkach homeostazy potencjału redoks w komórce, czynnik transkrypcyjny Nrf2 jest sekwestrowany w cytoplazmie przez połączenie motywami DLG i ETGE z białkiem inhibitorowym Keap1 (ryc. 2).

Jednak białko Keap1 w warunkach stresu oksydacyjnego, spełnia jednocześnie funkcje sensora potencjału oksydoredukcyjnego. Przez modyfikacje w regionach IVR i/lub BTB dochodzi do zerwania słabszego wiązania (tzw. „zatrzaśku”) z motywem DLG [87]. Rozluźnienie wiązania między Keap1 a Nrf2 stabilizuje Nrf2, pozwala uniknąć ubiquitynacji i jego translokacji do jądra komórkowego. Swoistymi sensorami zmian potencjału redoks są sulfhydrylowe ugrupowania obecne w cysteinie. Ludzkie białko Keap1 zawiera 27 cząsteczek cysteiny, jednak tylko grupy SH będące częścią konserwatywnych cystein, takich jak Cys23, Cys151, Cys273 i Cys288 spełniają istotną rolę w interakcji z czynnikiem Nrf2 [18]. Dwie z nich, Cys273 oraz Cys288, znajdują się w obrębie domeny IVR. W prawidłowych warunkach grupy SH pozostają zredukowane, co jest niezbędne do sekwestrowania czynnika Nrf2 w cytoplazmie oraz jego dalszej ubiquitynacji. Pod wpływem induktorów stresu oksydacyjnego czy związków chemioprewencyjnych, obydwie grupy tworzą połączenie poprzez mostek disiarczkowy w obrębie homodimeru, co prowadzi do rozluźnienia wiązania oraz uwolnienia Nrf2, a następnie jego akumulacji w jądrze oraz indukcji enzymów II fazy [40,95]. Można więc stwierdzić, iż zarówno Cys273, jak i Cys288 po potencjalnym utlenieniu, spełniają rolę represorów w proteosomalnej degradacji czynnika Nrf2. Badania Zhanga i Hanninka wykazały, że komórki z nadekspresją Cys151 w *Keap1* są bardziej wrażliwe na czynniki chemioprewencyjne, takie jak tert-bytylohydroksychinon (tBHQ) czy sulforafan, które wywołują zmiany strukturalne w grupach sulfhydrylowych białka Keap1. Tak więc Cys w pozycji 151 odgrywa istotną rolę w uwalnianiu i stabilizacji czynnika transkrypcyjnego Nrf2 z połączenia z białkiem Keap1. Dalsze badania tego zespołu wykazały również, iż modyfikacja w pozycji 151, polegająca na zamianie cysteiny na





Ryc. 2. Oddziaływanie Nrf2 z Keap1. Keap1 za pomocą domeny DGR jest powiązany z Nrf2 poprzez domenę Neh2. Wiązanie z motywem ETGE jest 100 razy silniejsze niż z motywem DLG zlokalizowanym w domenie Neh2. Cul3 zaangażowana w dysocjacje kompleksu Nrf2-Keap1 jest związana w regionie IVR białka Keap1

serynę i ekspozycja na induktory, nie wywołuje spodziewanej stabilizacji czynnika Nrf2, mimo niezmiennych Cys273 i Cys288 [107]. Może to wskazywać, iż zmiany konformacyjne w obrębie cysteiny w pozycji 151 białka Keap1, są niezbędne do jego uwolnienia z kompleksu, jaki tworzy z czynnikiem Nrf2. Odmiennie znaczenie tej cysteiny wykazali Rachakonda i wsp., wykorzystując model, w którym kowalencyjna rearanżacja w obrębie Cys w pozycji 151 doprowadziła do zerwania połączenia Keap1-Cul3 [71].

Innym mechanizmem wpływającym na aktywność Keap1 jest fosforylacja i defosforylacja tyrozyny w pozycji 141. Keap1 jest syntetyzowany *de novo* z ufosforylowaną Tyr141, co jest istotne dla jego stosunkowo długiego okresu półtrwania. W takiej też postaci Keap1 bierze udział w wiązaniu, ubikwitynacji i degradacji Nrf2. Stres oksydacyjny i elektrofile powodują jednak defosforylację Tyr141, co znacznie zmniejsza stabilność i przyspiesza degradację Keap1 [29].

Kolejna modyfikacja dotyczy treoniny w pozycji 55 białka Keap1. Badania wykazały, że białko szoku cieplnego, HSP90 (heat shock protein) aktywuje kinazę kazeinową CK2 (casein kinase 2), która fosforyluje treoninę w pozycji 55 białka Nrf2, co powoduje wzmocnienie oddziaływania między HSP90 i Keap1 [67]. Opisane wyżej mechanizmy

potwierdzają istotną rolę białka Keap1 w aktywacji czynnika Nrf2 w odpowiedzi na stres oksydacyjny i działanie potencjalnych induktorów Nrf2.

AKTYWACJA NRF2 PRZEZ FOSFORYLACJĘ Z UDZIAŁEM KINAZ

Wiele badań wykazało, że w aktywacji Nrf2, oprócz zmian w obrębie białka Keap1, są zaangażowane również inne mechanizmy, które wpływają na jego translokację do jądra. Wśród najważniejszych procesów wyróżnia się fosforylację Nrf2. Jednym z istotnych aminokwasów białka Nrf2 jest seryna 40 leżąca w obrębie domeny Neh2, której grupa hydroksylowa jest fosforylowana przez kinazę białkową C (PKC) (protein C kinase) [20]. Również kinaza białkowa umiejscowiona w siateczce śródplazmatycznej (PERK) (RNA-dependent protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) nasila translokację czynnika transkrypcyjnego Nrf2 przez osłabienie wiązania kompleksu białko inhibitor, co chroni komórkę przed stresem oksydacyjnym [9,10]. Podobnie kinaza kazeinowa 2 (CK2) (casein kinase 2), która katalizuje fosforylację w domenach Neh4 i Neh5 czynnika Nrf2, odgrywa istotną rolę w jego aktywacji [3].

Zmiany zachodzące w obrębie mikrofilamentów aktywnych w wyniku odpowiedzi na stres oksydacyjny dopro-

wadzają do translokacji czynnika Nrf2 do jądra. W procesie tym bierze udział kinaza fosfatydylo-3-inozytolu (PI3K) (phosphoinositide 3-kinase) [32]. Inne badania wykazały, że w indukcję ścieżki Nrf2/ARE są zaangażowane kinazy aktywowane mitogenami (MAPK) (mitogen-activated protein kinase), takie jak kinazy ERK2 (extracellular signal-regulated kinase 2) i JNK1 (Jun N-terminal kinase 1) [35,64,101]. Na podstawie powyższych przykładów wydawać się może, iż fosforylacja czynnika Nrf2 z udziałem kinaz koreluje z jego aktywacją i kumulacją w jądrze. Jednak nie wszystkie kinazy spełniają taką funkcję. W obrębie kinaz MAPK izoforma p38 hamuje dysocjację kompleksu Keap1-Nrf2, przez co nie dochodzi do aktywacji czynnika Nrf2. Potwierdziły to badania Keuma i wsp., w których wykazano indukcję HO-1 pod wpływem sulforafanu w komórkach nowotworowych HepG2 [36]. Badania Strachana i wsp. dowiodły, że zbyt długa kumulacja Nrf2 w jądrze komórkowym prowadzić może do apoptotycznej śmierci komórki [80]. Przykładem są myszy *keap1^{-/-}*, które wykazały trwałą kumulację i aktywację Nrf2 w jądrze, co objawia się śmiertelnością poporodową spowodowaną niedożywieniem wynikającym ze zrogowacenia przełyku i żołądka [96]. Dalsze badania wskazały na istotną rolę kinazy Fyn, należącej do rodziny kinaz tyrozynowych Src, pełniącej rolę molekularnego przelącznika. Powoduje ona fosforylację Tyr568 w obrębie czynnika Nrf2, co reguluje eksport z jądra komórkowego, a następnie jego degradację [28]. Nadrzędną rolę w aktywacji kinazy Fyn spełnia kinaza 3 β syntazy glikogenowej (GSK3 β) (glycogen synthase kinase 3 β), której aktywna postać fosforyluje kinazę Fyn w resztach treoninowych [27]. Istnieją także dane wskazujące, iż GSK3 β może bezpośrednio fosforylować białkowy czynnik Nrf2, wyłączając komórkową odpowiedź na stres oksydacyjny, przez jego przeniesienie z jądra komórkowego [73].

Aktywacja Nrf2 z udziałem kinaz jest kolejną alternatywną ścieżką, mogącą prowadzić do indukcji enzymów II fazy w następstwie działania stresu oksydacyjnego i czynników chemioprewencyjnych. Jednak mechanizm aktywacji Nrf2 z udziałem kinaz wymaga przeprowadzenia dalszych badań w celu dokładnego wyjaśnienia.

MECHANIZM REGULACJI NRF2

Mimo zaawansowanego poznania procesu aktywacji Nrf2, mechanizmy leżące u podstaw jego regulacji nadal nie są do końca zrozumiałe. Wiele badań wykazało, że niezbędnymi elementami do translokacji czynnika do jądra są sekwencja lokalizacji jądrowej bNLS (bipartite nuclear localization signal) oraz sekwencja eksportu z jądra NES_{zip} (nuclear export signal) [26]. Obydwie sekwencje sygnałowe znajdują się w części C-końcowej a subkomórkowe umiejscowienie Nrf2 zależy od równowagi między eksportem a importem do jądra komórkowego [48]. Istnieją doniesienia o jeszcze jednym ważnym motywie, który może decydować, po której ze stron błony jądrowej ma być umiejscowiony czynnik transkrypcyjny Nrf2. Nazwano go NES_{TA} (TA - transactivation domain) i znajduje się w domenie Neh5 [49]. Funkcją

NES_{TA} w warunkach stresu oksydacyjnego jest wzmacnianie, a w przypadku jego braku hamowanie translokacji do jądra Nrf2. Spełnia tym samym dodatkową rolę regulacyjną w przekazywaniu sygnału. Pod wpływem działania stresu oksydacyjnego, czy też czynników chemioprewencyjnych, z wykorzystaniem analizy immunofluorescencyjnej oraz immunoblotu, wykazano iż czynnik Nrf2 zaczyna kumulować się już 15 minut po ekspozycji, natomiast eksport z jądra pojawia się po 8 godzinach [26].

Wszystkie dotychczas opisane mechanizmy regulacji czynnika Nrf2 prowadzą do kontroli jego zdolności łączenia się z sekwencją ARE i nasilenia transkrypcji genów kodujących enzymy II fazy. Aby było to możliwe czynnik transkrypcyjny Nrf2 musi najpierw połączyć się z małymi białkami Maf (sMaf), tworząc heterodimer, zdolny do pełnienia funkcji regulacyjnych [23]. Do białek sMaf zaliczają się: MafF, MafG i MafK, a ich wspólną cechą jest konserwatywny region zasadowy oraz motyw zamka leucynowego [63]. Tworzący się homodimer sMaf/sMaf nie ma możliwości wzmacniania transkrypcji i traktowany jest jako jej represor [88]. Utworzenie się heterodimeru Nrf2/sMaf wykazuje powinowactwo i zdolność do łączenia się z ARE oraz tym samym wzmacnianiem ekspresji całej grupy enzymów cytoprotekcyjnych [103].

Istotny jest także sposób oddziaływania koaktywatorów z Nrf2, które są niezbędne do interakcji z DNA. Należą do nich CBP (CREB-binding protein), a także p300, CARM1, PRMT1, RAC3 oraz SRC3 [52]. Czynnik Nrf2 łączy się z białkami CBP za pomocą domen Neh4 oraz Neh5 [34]. Ponadto wykazano, że p300/CBP ma zdolność acetylowania reszt lizyny obecnych w domenie Neh1, tym samym zwiększając wiązanie Nrf2 do promotorów genów, zawierających w swej sekwencji strukturę elementu odpowiedzi antyoksydacyjnej [82]. Choć białka z rodziny Maf i CBP są niezbędne do łączenia się z czynnikiem Nrf2, ponieważ prowadzą do wzmocnienia ochrony antyoksydacyjnej, opisano dotąd kilka jeszcze innych białek, których rola w tym procesie na poziomie jądra komórkowego jest nie mniej istotna. Warto w tym miejscu wymienić białko KAP1 (KRAB-associated protein 1). Dowiedziono, iż ułatwia ono aktywność transkrypcyjną Nrf2, przez łączenie się z jego N-kończącą domeną transaktywacyjną, Neh3. Ponadto mutacja typu *KAP1* knockdown powodowała wzrost wrażliwości na stres oksydacyjny [58]. Odmienne działanie wykazuje białko Bach1 w przypadku regulacji Nrf2. Jest ono jak gdyby antagonistą Nrf2, ponieważ łączy się z sekwencją ARE, ale oddziaływanie to nie prowadzi do ekspresji genów, wręcz przeciwnie, odpowiada za jej hamowanie [12]. Małe białka Maf mają zdolność łączenia się z Bach1. Tak więc w zależności od zaangażowania drugiego białka do dimeryzacji z sMaf, może mieć ono wpływ na aktywację lub represję ścieżki sygnalizacyjnej [63].

Nrf2 po odłączeniu od sekwencji ARE, ulega degradacji przez przyłączenie reszt ubiquityny przez zasocjowaną



z Keap1 ligazę ubikwityny (E3). Zachodzi to w obrębie domeny Neh2 w wyniku Cul3-E3-zależnej ubikwitynacji, z udziałem następujących enzymów: E1-enzym aktywujący ubikwitynę, E2-enzym przenoszący zaktywowaną ubikwitynę i E3-enzym ligaza ubikwityny. Keap1 odgrywa istotną rolę w regulacji ubikwitynacji Nrf2, ponieważ kullina 3 (Cul3) (cullin 3) będąca podjednostką kompleksu ligazy E3 wiąże się bezpośrednio do tego białka. W kolejnym etapie Nrf2 ulega degradacji za pośrednictwem proteasomu 26S w cytoplazmie. Wykazano, iż degradacja Nrf2 nie zachodzi wyłącznie w cytoplazmie, lecz może przebiegać także w jądrze komórkowym. Umożliwia to import kompleksu Keap1/Cul3-Rbx1 (ring-box protein-1) do jądra, który jest istotnym mechanizmem autoregulacji czynnika Nrf2. Kontroluje swoją degradację przez regulację ekspresji genów Cul3-Rbx1. Tak więc indukcja Cul3-Rbx1 przez Nrf2 prowadzi do obniżenia poziomu tego czynnika [84,87].

Podobny wpływ ma protymozyna α (PTM α), peptyd wyizolowany z grasicy, może się łączyć z domeną DGR, podobnie jak czynnik Nrf2 [37]. Zawiera jednocześnie w swej strukturze sygnał lokalizacji jądrowej (NLS), a tym samym więc może być w tym procesie swoistym przenośnikiem całego kompleksu [69]. Odkryto również, że małe białko karioferyna KPNA6, znana jako importyna alfa 7, także jest zdolna do przenoszenia przez błonę jądrową Keap1, dzięki interakcji z jego C-końcowym fragmentem [83]. Istnieją również doniesienia, że Keap1 ma zarówno sygnał lokalizacji jądrowej, jak i sygnał eksportu, przez co przenika do jądra, odłącza Nrf2 od sekwencji ARE, a cały taki kompleks powraca do cytoplazmy, gdzie następuje degradacja czynnika transkrypcyjnego [65].

W ramach odpowiedzi na stres oksydacyjny Jaiswal zaproponował teorię, na podstawie, której można wyróżnić dwie fazy odpowiedzi na stres. Wczesna odpowiedź na stres, powoduje translokację Nrf2 do jądra i aktywację ekspresji genów zależnych od ARE. Natomiast odpowiedź późna dotyczy przyłączania innych białek, takich jak Bach1:MafG, MafG/K/F:MafG/K/F, c-Jun:c-Fos oraz kompleksów c-Jun z powiązaniem z Fos antygenem 1 (Fra-1) (Fos-related antygen-1), czy kinazy Fyn, które wiążąc się do ARE hamują ekspresję genów indukowaną przez Nrf2 [30].

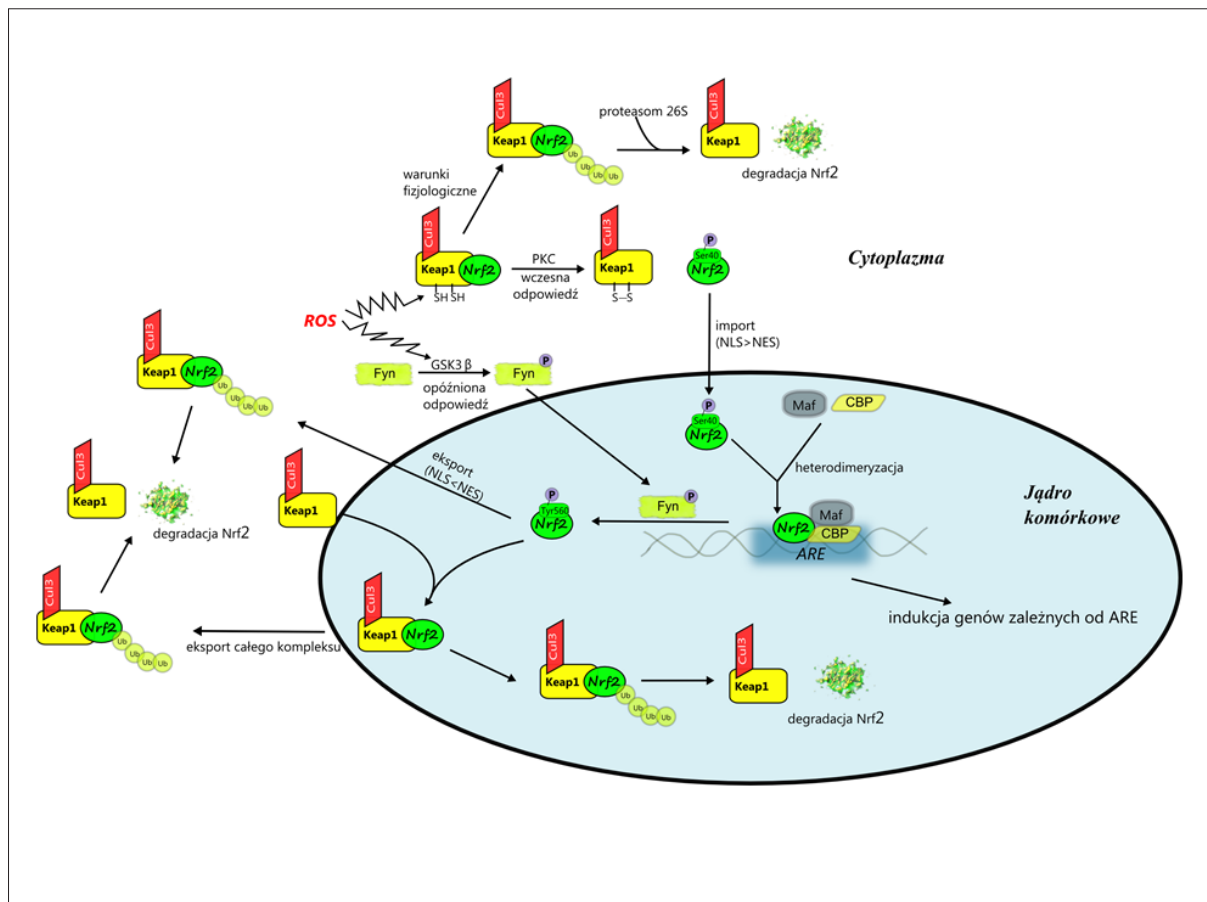
Podsumowując, mechanizm aktywacji czynnika Nrf2 jest regulowany na wielu etapach, co w zarysie przedstawiono na ryc. 3. Mimo złożonego procesu aktywacji czynnika Nrf2, istnieje wiele potencjalnych miejsc do interwencji terapeutycznej. Jednocześnie indukcja Nrf2, może wywoływać niekorzystne zmiany na poziomie komórkowym i być powiązana z wieloma chorobami, takimi jak nowotwory czy choroby neurodegeneracyjne.

NRF2 - KORZYSTNA ROLA W TERAPII I CHEMIOPREWENCJI

Chorobę nowotworową charakteryzuje bardzo często długi okres czasu od inicjacji, aż do pełnoobjawowego stanu chorobowego. Proces kancerogenezy może trwać

kilka miesięcy czy nawet lat. Najistotniejszą przyczyną pojawiania się nowotworów są mutacje w obrębie genów, które poprzez różne mechanizmy prowadzą do nieprawidłowego rozwoju komórek. Wówczas prawidłowe komórki nabywają cechy komórek nowotworowych, takich jak: niekontrolowany wzrost, unikanie supresorowych sygnałów wzrostu, nieuleganie procesowi apoptozy, indukcji angiogenezy, zdolności do inwazji odległych tkanek i procesu metastazy oraz zmiany metabolizmu [16]. Uszkodzenia materiału genetycznego w głównej mierze są spowodowane przez substancje kancerogenne i ich metabolity, które ulegają wprawdzie detoksykacji i eliminacji. Jednak w przypadku długotrwałego narażenia bądź jednorazowego kontaktu z silnym kancerogenem, mechanizmy naprawy mogą nie być wystarczające do zahamowania procesu nowotworowego. Leki przeciwnowotworowe w wielu przypadkach nie zawsze są skuteczne, co wynika często ze stosowania ich w bardzo zaawansowanych stadiach choroby [31]. Alternatywą do klasycznego podejścia do terapii nowotworów jest skoncentrowanie się na kontroli procesu kancerogenezy i próbie oddziaływania terapeutycznego na jego wczesnych stadiach. Takie podejście z wykorzystaniem naturalnych bądź syntetycznych, małowcząstkowych substancji chemicznych w celu inhibicji czy odwrócenia procesu kancerogenezy na różnych jej etapach nazywane jest chemioprewencją [79]. Zaproponowanie takiej koncepcji walki z chorobą nowotworową sprawiło, iż w przeciągu ostatniego półwiecza przeprowadzono wiele badań, czego skutkiem są różne strategie chemioprewencyjne. Ze względu na punkty uchwytu i potencjalne cele, czynniki chemioprewencyjne można podzielić na dwie grupy: związki supresyjne, wpływające na już zainicjowane komórki nowotworowe i związki antyinicjujące (blokujące) [100]. Substancje blokujące proces nowotworzenia mogą działać przez zmianę wolnych rodników, pobudzanie naprawy uszkodzonego DNA, czy też wpływając na poziom enzymów I i II fazy metabolizmu. Natomiast związki należące do grupy supresorów oddziałują głównie na ekspresję genów odpowiedzialnych za proliferację i podziały komórek, zmniejszając je, a także przywracając prawidłowy poziom i przebieg apoptozy, tym samym nie doprowadzając do kumulacji uszkodzonych komórek [57].

Aktywacja czynnika Nrf2 w odpowiedzi na stres oksydacyjny i czynniki chemioprewencyjne jest więc jednym z przykładów strategii w chemioprewencji [47]. Przez indukcję tej ścieżki sygnalizacyjnej można doprowadzić do unieczynnienia substancji toksycznych w tym także wolnych rodników zdolnych do uszkodzenia DNA [15]. Skoro więc organizm dysponuje tak skutecznym mechanizmem ochrony, warto zadać sobie pytanie dlaczego istnieje potrzeba jego sztucznej stymulacji? Hybertson i wsp. sugerują, iż trzeba wspomóc system w odpowiednim czasie, np. w sytuacjach wysokiego narażenia oraz wpłynąć na odpowiedź, w chwili gdy poziom niekorzystnych czynników przerasta możliwości detoksykacyjne komórki [21]. Pojawiły się doniesienia o obniżeniu aktywacji ścieżki Nrf2 wraz z wiekiem, co może powodować słabszą odpowiedź antyoksydacyjną [89].



Ryc. 3. Mechanizm aktywacji i inaktywacji czynnika Nrf2. W fizjologicznych warunkach Nrf2 jest w cytosolu związany z białkiem represorowym Keap1. Kompleks Nrf2 –Keap1 przyłącza reszty ubiquityny, poprzez ligazę zależną od Cul3, która jest przyłączona do Keap1. Taki kompleks jest rozpoznawany przez proteasom 26S, co prowadzi do ubiquitynacji i dalej do degradacji Nrf2. W warunkach stresowych, czyli pod wpływem oddziaływania RFT lub elektrofilów, dochodzi do zerwania wiązania Nrf2-Keap1. Za dysocjację tego kompleksu mogą być odpowiedzialne zmiany konformacyjne w białku Keap1 oraz fosforylacja Nrf2 przez kinazy, m.in. PKC i GSK3β. Nrf2 ulega translokacji do jądra, gdzie jest poddany heterodimeryzacji z białkiem Maf i CBP. Przyłączenie całego kompleksu do DNA inicjuje proces transkrypcji genów zawierających w promotorze sekwencje odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE)

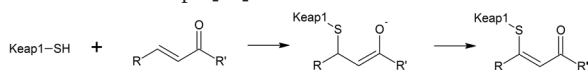
Zwraca się jednocześnie uwagę na zaangażowanie czynnika Nrf2 w hamowaniu procesów zapalnych oraz chorób neurodegeneracyjnych, np. choroba Alzheimera i Parkinsona [44,56,92]. Nrf2 zmniejsza poziom czynników prozapalnych, takich jak: cyklooksygenaza 2 (COX-2), syntaza tlenu azotu (iNOS), IL-1β, IL-6 oraz TNF-α [38]. Jednocześnie stanom zapalnym towarzyszy nadmierne powstawanie RFT, które mogą bezpośrednio oddziaływać z kinazami MAPK i tym samym wpływać na ścieżki zależne zarówno od Nrf2, jak i odgrywającego w tych procesach główną rolę czynnika transkrypcyjnego NF-κB. To sprzężenie między aktywacją Nrf2 i inhibicją NF-κB może być wykorzystane zarówno w projektowaniu leków przeciwzapalnych, jak i w poszukiwaniu związków chemioprewencyjnych i terapeutycznych [74].

Wśród induktorów enzymów II fazy znajduje się wiele związków występujących w jadalnych owocach i warzywach, a także przyprawach i ziołach. Stwarza to możliwość dostarczania ich w codziennej diecie, a dzięki regularnemu i odpowiednio długiemu okresowi przyjmowania, mogą pełnić funkcję czynników chemioprewen-

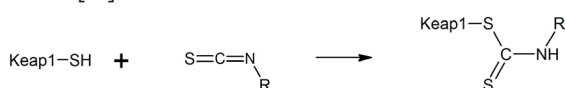
cyjnych. Do powszechnie występujących w przyrodzie związków aktywujących enzymy II fazy należą m.in.: polifenole, izotiocyjaniiny, flawonoidy, tiokarbaminiany, chinony, ditiolotony [5,56] (tabela 1), a które zostały szerzej omówione wcześniej [42]. W wyniku syntezy chemicznej powstały syntetyczne modulatory aktywacji Nrf2, takie jak oltipraz, czy butylohydroksyanizol (BHA) [22]. Związki te są zdolne do zerwania wiązania między Nrf2 i Keap1, co umożliwia nasilenie ekspresji enzymów II fazy. Mechanizm oddziaływania dotyczy przede wszystkim reakcji z ugrupowaniami sulfhydrylowymi, w reaktywnych domenach białek Nrf2 i Keap1 zawierających cysteinę. Jednym z zaproponowanych mechanizmów przez Dinkova-Kostova i wsp. jest reakcja tio-Michaela [13]. Grupa -SH z niesparowaną parą elektronową na atomie siarki, odgrywa rolę słabej zasady Lewisa i przez to może ulec addycji nukleofilowej do nienasyconego związku karbonylowego. Induktory ścieżki Nrf2-ARE odgrywają więc w tej reakcji rolę akceptorów. Przyłączenie induktora do grupy -SH zmniejsza powinowactwo Keap1 do Nrf2, powodując jednocześnie dysocjację i nasilenie ekspresji genów kodujących enzymy II fazy. Niżej przedstawiono



reakcje Michaela jako mechanizm interakcji induktorów Nrf2 z ugrupowaniem sulfhydrylowym obecnym w cysteinie w białku Keap1 [56]:



Nieco odmienny charakter ma interakcja związków zawierających w swej strukturze atom siarki. Dzięki oddziaływaniu elektrofilowemu ugrupowania -N=C=S , a zwłaszcza atomu węgla, otoczonego przez dwa bardziej elektroujemne atomy siarki oraz azotu, następuje przekształcenie cząsteczki izotiocyanianu w ditiokarbaminian, co jest równoznaczne ze zmniejszeniem wiązania Nrf2-Keap1 i tym samym indukcją genów enzymów II fazy zależnych od Nrf2 [56]:



Chemioprewencyjne właściwości związków chemicznych nie ograniczają się jedynie do bezpośredniego stymulowania enzymów detoksykacyjnych przez aktywację czynnika Nrf2. Badania wykazały, iż związki np. takie jak: EGCG, kurkumina, resweratrol czy genisteina mają również zdolność regulacji ekspresji genów poprzez mechanizmy epigenetyczne, takie jak metylacja DNA, modyfikacja chromatyny oraz zaangażowanie miRNA [50,51]. Wykazano, iż sulforafan ma zdolność regulowania demetylacji wysp CpG czynnika Nrf2 w komórkach nowotworowych, a tym samym indukowania odpowiedzi antyoksydacyjnej, co świadczy o jego chemioprewencyjnych właściwościach [106]. Prawie identyczny mechanizm opisano dla z-ligustilidu, związku wyizolowanego z korzenia dzięgiela chińskiego (*radix Angelica Sinensis*) i jego wpływu na komórki raka stercza [81]. Wykorzystanie epigenetycznej modulacji indukcji odpowiedzi antyoksydacyjnej przez Nrf2 stwarza więc potencjalne nowe możliwości terapeutyczne w obrębie ścieżki sygnałowej regulowanej przez ten czynnik transkrypcyjny.

Mechanizmy leżące u podstaw regulacji oddziaływania Nrf2-Keap1 nadal pozostają niewyjaśnione. Choć znamy bardzo wiele związków wpływających na ten szlak przekazywania sygnału, dalsze badania powinny być ukierunkowane na swoiste oddziaływania tych substancji na poziomie komórkowym. W przyszłości dokładniejsze poznanie molekularnych podstaw indukcji odpowiedzi antyoksydacyjnej pozwoli opracować preparaty farmaceutyczne mogące celowo i z dużą efektywnością indukować ścieżkę Nrf2-ARE. Być może dzięki temu możliwa będzie skuteczniejsza prewencja i walka z nowotworami, u których podstaw leżą zaburzenia homeostazy redoks.

NRF2 - CZYNNIK PATOGENNY

Mimo pozytywnego znaczenia czynnika Nrf2 w hamowaniu procesu kancerogenezy zauważono również, że może być zaangażowany w procesy promocji i rozwoju nowotworów. Jak już wspomniano komórki nowotworowe cha-

Tabela 1. Przykłady potencjalnych induktorów ścieżki Nrf2-ARE

Klasa chemiczna	Struktura chemiczna	Przykład związku
Naturalne induktory		
CHALKONY		ksantohumol [43]
IZOTIOCYJANIANY		sulforafan [106]
POLIFENOLE		resweratrol [56]
FLAWONOIDY		gallusan-3-epigallocatechiny (EGCG) [46]
POLIENY		likopen [56]
REAKTYWNE FORMY TLENU	HO-OH OH•	nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy [5]
Syntetyczne induktory		
DITIOLOTONY		oltipraz [22]
TERPENY		CDDO kwas 2-cyjano-3,12-diooksooleana-1,9(11)-dien-28-owy [77]
POLIFENOLE		tBHQ (tert-butylhydrochinon) [107]

rakteryzują się mutacjami w materiale genetycznym, co daje im swoistą niezależność, ale też pewnego rodzaju „nieśmiertelność”. W czasie intensywnego wzrostu komórek rośnie zapotrzebowanie energetyczne, którego źródłem są mitochondria. Jednak zwiększone wytwarzanie ATP, niezbędne do wzrostu i różnicowania komórek nowotworowych, sprzyja powstawaniu w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym znacznych ilości RFT. Jeśli nie będzie temu procesowi towarzyszyła wzmocniona odpowiedź antyoksydacyjna lub sprawnie działający system enzymów antyoksydacyjnych może dojść do wyłączenia cyklu komórkowego i indukcji apoptozy.

Stymulując odpowiedź antyoksydacyjną, a tym samym doprowadzając do inhibicji apoptozy, czynnik Nrf2 promuje przetrwanie i rozwój komórek nowotworowych [18]. DeNicola i wsp. wykazali, że wiele onkogenów, takich jak: *Myc*, *K-Ras* oraz *B-Raf*, może się przyczyniać do wzmocnienia ekspresji Nrf2, a tym samym zahamowania wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego, co w konsekwencji prowadzi do progresji onkogenezy [11].

Mutacje w obrębie Nrf2 opisano dla wielu nowotworów m.in. w raku przełyku, trzustki, skóry czy płuc, w których jednocześnie oszacowano częstość występowania mutacji dotyczących molekularnych interakcji Keap1-Nrf2 na około 25% [18,39,53]. Najczęściej opisywane zmiany dotyczą motywów ETGE i DLG domeny Neh2, jak również domeny Kelch/DGR, które odpowiadają za połączenie Nrf2 i Keap1. Objawiają się zwiększonym poziomem Nrf2 w komórce przez osłabienie interakcji ze swoistym inhibitorem, a tym samym pominięciem procesu degradacji. Głównym skutkiem tych somatycznych mutacji jest zwiększenie oddziaływania czynnika transkrypcyjnego na odpowiednie geny, a zarazem indukcja ich ekspresji [46,84].

Mutacje w obrębie omawianego czynnika transkrypcyjnego mogą dotyczyć również zjawisk epigenetycznych, które nie mają swojego odzwierciedlenia w sekwencji jądrowego DNA. Wykazano bardzo małą ekspresję lub całkowity brak mRNA białka Keap1 w niektórych liniach komórkowych raka płuc. Było to związane z hipermetylacją wysp CpG promotorowego regionu genu *Keap1*. Dowiedziono również, że zastosowanie 5-aza-2'-deoksycytyny przywraca prawidłowe ilości mRNA *Keap1* [97]. Tym samym można stwierdzić, iż nadekspresja Nrf2 w komórkach nowotworowych może być związana m.in. ze zjawiskiem epigenetycznego wyciszenia genu jego inhibitora.

Poważnym problemem w skutecznej chemioterapii nowotworów staje się coraz częściej oporność komórek na zastosowane leczenie. Jest to związane z farmakologicznymi właściwościami większości leków chemioterapeutycznych. Ich wąski indeks terapeutyczny, a więc różnica między dawką efektywną a toksyczną, powoduje, że często stężenie w miejscu działania, czyli w pobliżu komórek nowotworowych nie jest wystarczające. Może to być spowodowane np. zbyt nasilonym metabolizmem, ograniczonym poziomem aktywacji proleków, złą farmakokinetyką oraz wpływem mikrośrodowiska nowotworu [45].

Więszym problemem staje się mechanizm powiązany z komórkową opornością wielolekową, MDR (multi-drug resistance). Zjawisko to najczęściej jest spowodowane przez refluks ksenobiotyków do przestrzeni pozakomórkowej. Pozwala to komórkom nowotworowym uniknąć toksycznego działania czy też ingerencji leku w molekularne procesy wewnątrzkomórkowe, a co za tym idzie zwiększyć swoją przeżywalność. Głównymi białkami, które odpowiadają za transport leków poza komórkę są transportery ABC (ATP-binding cassette transporter, ABC), stanowiące rodzinę białek zawierających kasetę wiążącą ATP. Najważniejszymi przedstawicielami tej grupy są glikoproteina P (zwana również MDR-1/P-gp lub ABCB1), białko MRP (multidrug resistance protein) (ABCC1) oraz BCRP (breast cancer resistance protein) (ABCG2) [104]. Badania wykazały, że czynnik Nrf2 wpływa aktywnie na wzmocnienie ekspresji szczególnie dwóch ostatnich białek [17,75,94]. Wskazuje to, iż Nrf2 zwiększa oporność komórek nowotworowych na leczenie. Ponadto wykazano zależność między poziomem czynnika Nrf2 a opornością na leki, takie jak cisplatyna, doksorubicyna, etopozyd i 5-fluorouracyl [2,76,99]. Pacjenci z mutacją powodującą nadekspresję układu *Keap1-Nrf2* mają gorsze rokowania, co się wiąże z tym, iż komórki nowotworowe są chronione przed chemioterapią na podobnej zasadzie jak funkcjonuje fizjologiczna obrona przed stresem oksydacyjnym [18]. W celu zwiększenia skuteczności terapii represja tej ścieżki sygnałowej może się okazać kluczowa. Dlatego w tym celu można wykorzystać inhibitory Nrf2, do których należy np. popularna witamina C. Zastosowanie witaminy C spowodowało spadek stężenia GSH i wzrost odpowiedzi na lek w linii komórkowej pochodzącej z ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej KCL22/SR odpornej na inhibitor kinazy tyrozynowej BCR/ABL - imatinib. Było to wynikiem zmniejszenia przez witaminę C, *per se* jako antyoksydanta, poziomu RFT i supresji wiązania Nrf2-DNA w regionie promotorowym genu *syntetazy γ -glutamylcysteiny (γ -GCS)* [86]. Zmiany potencjału redoks spowodowane antyoksydantami mogą więc wpływać hamująco na ekspresję genów zależną od Nrf2, a tym samym zmniejszyć oporność na leki. Istnieje także hipotetyczna możliwość ograniczenia ekspresji enzymów znajdujących się pod kontrolą czynnika Nrf2 przez takie środki jak: tiazolidinediony (doustne leki hipoglikemizujące, np. pioglitazon, rosiglitazon), kwas retinowy czy 17 β -estradiol. Związki te indukują odpowiednio: receptory aktywowane przez proliferatory peroksyosomów γ (PPAR γ), receptor kwasu retinowego α (RAR α) oraz receptor estrogenowy α (ER α) [18,54,78]. Badania wykazały, że w obecności kwasu retinowego, Nrf2 tworzy kompleks z receptorem RAR α [98]. Kompleks taki nie ma zdolności przyłączenia się do sekwencji ARE i wzmocnienia transkrypcji genów. Podobną zależność opisano dla receptorów PPAR γ , dla których sugeruje się nawet, że połączenie tiazolidinedionów z lekami przeciwnowotworowymi może zmniejszyć oporność na leczenie komórek nowotworowych raka płuc [105]. Możliwości zahamowania ścieżki Nrf2 mają również związki małowcząsteczkowe obecne w roślinach. Na przykład luteolina, należąca do flawonoidów, a występująca powszechnie w selerze, zielonej papryce, pietruszce czy rumianku, jest potencjalnym inhi-

bitorem czynnika transkrypcyjnego z powodu redukcji jego ilości zarówno na poziomie białka jak i mRNA [85]. Podobne właściwości ma apigenina, która wykazuje zdolność uwrażliwienia pierwotnie opornych komórek raka wątroby na leczenie doksorubicyną [14]. Wykorzystanie inhibitorów Nrf2 może się okazać obiecującym elementem farmakoterapii, pozwalającym zmniejszyć oporność komórek rakowych na zastosowane środki cytotoksyczne, przyczyniając się tym samym do wzrostu skuteczności leczenia chorób nowotworowych. Jednak do pełnego zrozumienia wszystkich implikacji wynikających z udziału Nrf2 w promowaniu onkogenezy, a zwłaszcza oporności wielolekowej, konieczne jest przeprowadzenie dokładniejszych badań.

W przeciwieństwie do omówionego mechanizmu lekooporności komórek nowotworowych stymulowanych przez czynnik Nrf2 pojawia się idea wykorzystania zwiększonej ekspresji enzymów II fazy do celów terapeutycznych. Niektóre leki chemioterapeutyczne muszą zostać w organizmie aktywowane do farmakologicznie czynnej postaci, ponieważ podawane są w postaci proleków. Reakcje aktywacji najczęściej zachodzą z udziałem cytochromu P450, przykładem może być reakcja konwersji cyklofosfamidu do alkilujących metabolitów. Hayes i McMahon zauważyli, że w komórkach nowotworowych, które wykazują mutację w układzie *Nrf2-Keap1*, występuje jednocześnie zwiększony poziom ekspresji, takich enzymów jak NQO1, co umożliwia aktywację cytotoksycznych leków [18]. Stwarza to jednocześnie możliwość podania mniejszych dawek leków, a przez to zmniejszenie niepożądanych działań.

Czynnik Nrf2, oprócz stymulowania genów kodujących enzymy detoksykacyjne, ma zdolność indukowania wielu białek, które w sekwencji promotorowej swego genu mają tzw. element odpowiedzi antyoksydacyjnej. W fizjologicznych warunkach, dzięki ARE jest możliwe przetrwanie komórki przez wzmocnienie transkrypcji białek ochronnych i promujących przetrwanie. Do takich białek należy m.in. antyapoptotyczne białko Bcl-xL. W komórkach nowotworowych jego indukcja jest jednak niekorzystna, gdyż unikanie programowanej śmierci może prowadzić do progresji nowotworu. Badania wykazały, iż Nrf2 stymuluje ekspresję Bcl-xL przez łączenie się z sekwencją ARE [68]. Tym samym można przypuszczać, że komórki nowotwo-

rowe zyskują zdolność unikania apoptozy, jeśli dochodzi do aktywacji ścieżki Nrf2, czy to poprzez mutacje, czy terapie antyoksydantami.

Wzmoczona proliferacja komórek, która jest charakterystyczna dla procesu onkogenezy, nie byłaby możliwa bez zapewnienia odpowiedniej ilości materiału budulcowego oraz energetycznego. Modyfikacja, czy też całkowite prze-programowanie metabolizmu w kierunku optymalizacji wzrostu jest jedną z podstawowych cech we wszystkich nowotworach [16]. Sugeruje się, że dużą rolę w tym procesie może odgrywać czynnik Nrf2, który szczególnie pod wpływem szlaku sygnałowego kinazy PI3K-Akt, przekierowuje glukozę oraz glutaminę na anaboliczne ścieżki metaboliczne [61].

PODSUMOWANIE

Rola czynnika Nrf2, pod którego kontrolą pozostaje wiele istotnych dla komórkowej homeostazy genów o działaniu cytoprotekcyjnym, jest przedmiotem wielu badań, które wskazują, że nie można jej jednoznacznie określić. Z jednej strony aktywacja czynnika Nrf2 wywołuje indukcję enzymów II fazy zależnych od ARE – elementu odpowiedzi na antyoksydanty, co sprzyja detoksykacji kancerogenów i elektrofilowych metabolitów, mogących indukować powstanie stresu oksydacyjnego. W inicjacji i progresji nowotworu stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę, dlatego wpływ na aktywację czynnika Nrf2 przez zmiany konformacyjne w białku Keap1 oraz fosforylację z udziałem kinaz jest ważną strategią w chemioprewencji. Z drugiej strony pojawiły się doniesienia o nadekspresji *Nrf2* w komórkach nowotworowych, co może chronić je przed cytotoksycznymi skutkami antynowotworowej terapii prowadząc do lekooporności. Aktywacja i inaktywacja Nrf2 chroni komórki przez RFT, apoptozę i sprzyja ich przeżywalności w niekorzystnych warunkach. Znajomość dualistycznego działania czynnika Nrf2 jest konieczna do oceny korzystnych i negatywnych skutków, szczególnie w profilaktyce i terapii nowotworów.

PODZIĘKOWANIE

Dziękujemy prof. Wandzie Baer-Dubowskiej za krytyczne uwagi dotyczące manuskryptu.

PIŚMIENICTWO

- [1] Adams J., Kelso R., Cooley L.: The Kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol.*, 2000; 10: 17-24
- [2] Akhdar H., Loyer P., Rauch C., Corlu A., Guillouzo A., Morel F.: Involvement of Nrf2 activation in resistance to 5-fluorouracil in human colon cancer HT-29 cells. *Eur. J. Cancer*, 2009; 45: 2219-2227
- [3] Apopa P.L., He X., Ma Q.: Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2008; 22: 63-76
- [4] Biswas M., Chan J.Y.: Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2010; 244: 16-20
- [5] Bryan H.K., Olayanju A., Goldring C.E., Park B.K.: The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem. Pharmacol.*, 2013; 85: 705-717
- [6] Chan J.Y., Han X.L., Kan Y.W.: Isolation of cDNA encoding the human NF-E2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 11366-11370
- [7] Chan J.Y., Kwong M., Lu R., Chang J., Wang B., Yen T.S., Kan Y.W.: Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor,

Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice. *EMBO J.*, 1998; 17: 1779-1787

[8] Chan K., Lu R., Chang J.C., Kan Y.W.: NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 13943-13948

[9] Cullinan S.B., Diehl J.A.: PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 20108-20117

[10] Cullinan S.B., Zhang D., Hannink M., Arvisais E., Kaufman R.J., Diehl J.A.: Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 7198-7209

[11] DeNicola G.M., Karreth F.A., Humpton T.J., Gopinathan A., Wei C., Frese K., Mangal D, Yu K.H., Yeo C.J., Calhoun E.S., Scrimieri F., Winter J.M., Hruban R.H., Jacobuzio-Donahue C., Kern S.E., Blair I.A., Tuveson D.A.: Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*, 2011; 475: 106-109

[12] Dhakshinamoorthy S., Jain A.K., Bloom D.A., Jaiswal A.K.: Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 16891-16900

[13] Dinkova-Kostova A.T., Massiah M.A., Bozak R.E., Hicks R.J., Talalay P.: Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 3404-3409

[14] Gao A.M., Ke Z.P., Wang J.N., Yang J.Y., Chen S.Y., Chen H.: Apigenin sensitizes doxorubicin-resistant hepatocellular carcinoma BEL-7402/ADM cells to doxorubicin via inhibiting PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *Carcinogenesis*, 2013; 34: 1806-1814

[15] Giudice A., Montella M.: Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention. *Bioessays*, 2006; 28: 169-181

[16] Hanahan D., Weinberg R.A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144: 646-674

[17] Hayashi A., Suzuki H., Itoh K., Yamamoto M., Sugiyama Y.: Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 310: 824-829

[18] Hayes J.D., McMahon M.: NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem. Sci.*, 2009; 34: 176-188

[19] Holtzclaw W.D., Dinkova-Kostova A.T., Talalay P.: Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Adv. Enzyme Regul.*, 2004; 44: 335-367

[20] Huang H.C., Nguyen T., Pickett C.B.: Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 42769-42774

[21] Hybertson B.M., Gao B., Bose S.K., McCord J.M.: Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol. Aspects Med.*, 2011; 32: 234-246

[22] Iida K., Itoh K., Kumagai Y., Oyasu R., Hattori K., Kawai K., Shimazui T., Akaza H., Yamamoto M.: Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.*, 2004; 64: 6424-6431

[23] Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Hatayama I., Yamamoto M., Nabeshima Y.: An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 236: 313-322

[24] Itoh K., Igarashi K., Hayashi N., Nishizawa M., Yamamoto M.: Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 1995; 15: 4184-4193

[25] Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Ishii T., Igarashi K., Engel J.D., Yamamoto M.: Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.*, 1999; 13: 76-86

[26] Jain A.K., Bloom D.A., Jaiswal A.K.: Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 29158-29168

[27] Jain A.K., Jaiswal A.K.: GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 16502-16510

[28] Jain A.K., Jaiswal A.K.: Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 12132-12142

[29] Jain A.K., Mahajan S., Jaiswal A.K.: Phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine 141 regulate stability and degradation of Nrf2: a novel mechanism in Nrf2 activation. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 17712-17720

[30] Jaiswal A.K.: Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36: 1199-1207

[31] Johnson J.R., Williams G., Pazdur R.: End points and United States Food and Drug Administration approval of oncology drugs. *J. Clin. Oncol.*, 2003; 21: 1404-1411

[32] Kang K.W., Lee S.J., Park J.W., Kim S.G.: Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol. Pharmacol.*, 2002; 62: 1001-1010

[33] Katoh Y., Iida K., Kang M.I., Kobayashi A., Mizukami M., Tong K.I., McMahon M., Hayes J.D., Itoh K., Yamamoto M.: Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2005; 433: 342-350

[34] Katoh Y., Itoh K., Yoshida E., Miyagishi M., Fukamizu A., Yamamoto M.: Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells*, 2001; 6: 857-868

[35] Keum Y.S., Owuor E.D., Kim B.R., Hu R., Kong A.N.: Involvement of Nrf2 and JNK1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Pharm. Res.*, 2003; 20: 1351-1356

[36] Keum Y.S., Yu S., Chang P.P., Yuan X., Kim J.H., Xu C., Han J., Agarwal A., Kong A.N.: Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Res.*, 2006; 66: 8804-8813

[37] Khan H., Cino E.A., Brickenden A., Fan J., Yang D., Choy W.Y.: Fuzzy complex formation between the intrinsically disordered prothymosin α and the Kelch domain of Keap1 involved in the oxidative stress response. *J. Mol. Biol.*, 2013; 425: 1011-1027

[38] Khor T.O., Huang M.T., Kwon K.H., Chan J.Y., Reddy B.S., Kong A.N.: Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Cancer Res.*, 2006; 66: 11580-11584

[39] Kim Y.R., Oh J.E., Kim M.S., Kang M.R., Park S.W., Han J.Y., Eom H.S., Yoo N.J., Lee S.H.: Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J. Pathol.*, 2010; 220: 446-451

[40] Kobayashi A., Kang M.I., Watai Y., Tong K.I., Shibata T., Uchida K., Yamamoto M.: Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.*, 2006; 26: 221-229

[41] Kobayashi M., Itoh K., Suzuki T., Osanai H., Nishikawa K., Katoh Y., Takagi Y., Yamamoto M.: Identification of the interactive interface

and phylogenic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells*, 2002; 7: 807-820

[42] Krajka-Kuźniak V.: Induction of phase II enzymes as a strategy in the chemoprevention of cancer and other degenerative diseases. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 627-638

[43] Krajka-Kuźniak V., Paluszczak J., Baer-Dubowska W.: Xanthohumol induces phase II enzymes via Nrf2 in human hepatocytes *in vitro*. *Toxicol. In Vitro*, 2013; 27: 149-156

[44] Kundu J.K., Surh Y.J.: Nrf2-Keap1 signaling as a potential target for chemoprevention of inflammation-associated carcinogenesis. *Pharm. Res.*, 2010; 27: 999-1013

[45] Lage H.: An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008; 65: 3145-3167

[46] Lee J.H., Khor T.O., Shu L., Su Z.Y., Fuentes F., Kong A.N.: Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression. *Pharmacol Ther.*, 2013; 137: 153-171

[47] Lee J.S., Surh Y.J.: Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett.*, 2005; 224: 171-184

[48] Lee O.H., Jain A.K., Papusha V., Jaiswal A.K.: An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 36412-36420

[49] Li W., Yu S.W., Kong A.N.: Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 27251-27263

[50] Li Y., Kong D., Wang Z., Sarkar F.H.: Regulation of microRNAs by natural agents: an emerging field in chemoprevention and chemotherapy research. *Pharm. Res.*, 2010; 27: 1027-1041

[51] Li Y., Tollefsbol T.O.: Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components. *Curr. Med. Chem.*, 2010; 17: 2141-2151

[52] Lin W., Shen G., Yuan X., Jain M.R., Yu S., Zhang A., Chen J.D., Kong A.N.: Regulation of Nrf2 transactivation domain activity by p160 RAC3/SRC3 and other nuclear co-regulators. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2006; 39: 304-310

[53] Lister A., Nedjadi T., Kitteringham N.R., Campbell F., Costello E., Lloyd B., Copple I.M., Williams S., Owen A., Neoptolemos J.P., Goldring C.E., Park B.K.: Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy. *Mol. Cancer*, 2011; 10: 37

[54] Lo R., Matthews J.: The aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor alpha differentially modulate nuclear factor erythroid-2-related factor 2 transactivation in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2013; 270: 139-148

[55] Lo S.C., Li X., Henzl M.T., Beamer L.J., Hannink M.: Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J.*, 2006; 25: 3605-3617

[56] Magesh S., Chen Y., Hu L.: Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Med. Res. Rev.*, 2012; 32: 687-726

[57] Manson M.M., Gescher A., Hudson E.A., Plummer S.M., Squires M.S., Prigent S.A.: Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. *Toxicol. Lett.*, 2000; 112-113: 499-505

[58] Maruyama A., Nishikawa K., Kawatani Y., Mimura J., Hosoya T., Harada N., Yamamoto M., Itoh K.: The novel Nrf2-interacting factor KAP1 regulates susceptibility to oxidative stress by promoting the Nrf2-mediated cytoprotective response. *Biochem. J.*, 2011; 436: 387-397

[59] McMahon M., Itoh K., Yamamoto M., Chanas S.A., Henderson C.J., McLellan L.I., Wolf C.R., Cavin C., Hayes J.D.: The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res.*, 2001; 61: 3299-3307

[60] McMahon M., Thomas N., Itoh K., Yamamoto M., Hayes J.D.: Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 31556-31567

[61] Mitsuishi Y., Taguchi K., Kawatani Y., Shibata T., Nukiwa T., Aburatani H., Yamamoto M., Motohashi H.: Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell*, 2012; 22: 66-79

[62] Moi P., Chan K., Asunis I., Cao A., Kan Y.W.: Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 9926-9930

[63] Motohashi H., O'Connor T., Katsuoka F., Engel J.D., Yamamoto M.: Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene*, 2002; 294: 1-12

[64] Naidu S., Vijayan V., Santoso S., Kietzmann T., Immenschuh S.: Inhibition and genetic deficiency of p38 MAPK up-regulates heme oxygenase-1 gene expression via Nrf2. *J. Immunol.*, 2009; 182: 7048-7057

[65] Nguyen T., Sherratt P.J., Nioi P., Yang C.S., Pickett C.B.: Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 32485-32492

[66] Nioi P., Nguyen T., Sherratt P.J., Pickett C.B.: The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.*, 2005; 25: 10895-10906

[67] Niture S.K., Jaiswal A.K.: Hsp90 interaction with INrf2(Keap1) mediates stress-induced Nrf2 activation. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 36865-36875

[68] Niture S.K., Jaiswal A.K.: Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance. *Free Radic. Biol. Med.*, 2013; 57: 119-131

[69] Niture S.K., Jaiswal A.K.: Prothymosin- α mediates nuclear import of the INrf2/Cul3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 13856-13868

[70] Prochaska H.J., De Long M.J., Talalay P.: On the mechanisms of induction of cancer-protective enzymes: a unifying proposal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985; 82: 8232-8236

[71] Rachakonda G., Xiong Y., Sekhar K.R., Stamer S.L., Liebler D.C., Freeman M.L.: Covalent modification at Cys151 dissociates the electrophile sensor Keap1 from the ubiquitin ligase CUL3. *Chem. Res. Toxicol.*, 2008; 21: 705-710

[72] Rushmore T.H., Morton M.R., Pickett C.B.: The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 11632-11639

[73] Salazar M., Rojo A.I., Velasco D., de Sagarra R.M., Cuadrado A.: Glycogen synthase kinase-3 β inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 14841-14851

[74] Saw C.L., Kong A.N.: Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 as a chemopreventive target in colorectal cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2011; 15: 281-295

[75] Singh A., Wu H., Zhang P., Happel C., Ma J., Biswal S.: Expression of ABCG2 (BCRP) is regulated by Nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype. *Mol. Cancer Ther.*, 2010; 9: 2365-2376

[76] Slocum S.L., Kensler T.W.: Nrf2: control of sensitivity to carcinogens. *Arch. Toxicol.*, 2011; 85: 273-284

[77] Sporn M.B., Liby K.T., Yore M.M., Fu L., Lopchuk J.M., Gribble G.W.: New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress. *J. Nat. Prod.*, 2011; 74: 537-545

- [78] Sporn M.B., Suh N.: Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 525-530
- [79] Sporn M.B., Suh N.: Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 537-543
- [80] Strachan G.D., Ostrow L.A., Jordan-Sciutto K.L.: Expression of the fetal Alz-50 clone 1 protein induces apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 336: 490-495
- [81] Su Z.Y., Khor T.O., Shu L., Lee J.H., Saw C.L., Wu T.Y., Huang Y., Suh N., Yang C.S., Conney A.H., Wu Q., Kong A.N.: Epigenetic reactivation of Nrf2 in murine prostate cancer TRAMP C1 cells by natural phytochemicals Z-ligustilide and radix *Angelica sinensis* via promoter CpG demethylation. *Chem. Res. Toxicol.*, 2013; 26: 477-485
- [82] Sun Z., Chin Y.E., Zhang D.D.: Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Mol. Cell. Biol.*, 2009; 29: 2658-2672
- [83] Sun Z., Wu T., Zhao F., Lau A., Birch C.M., Zhang D.D.: KPNA6 (Importin $\alpha 7$)-mediated nuclear import of Keap1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response. *Mol. Cell. Biol.*, 2011; 31: 1800-1811
- [84] Taguchi K., Motohashi H., Yamamoto M.: Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*, 2011; 16: 123-140
- [85] Tang X., Wang H., Fan L., Wu X., Xin A., Ren H., Wang X.J.: Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011; 50: 1599-1609
- [86] Tarumoto T., Nagai T., Ohmine K., Miyoshi T., Nakamura M., Kondo T., Mitsugi K., Nakano S., Muroi K., Komatsu N., Ozawa K.: Ascorbic acid restores sensitivity to imatinib via suppression of Nrf2-dependent gene expression in the imatinib-resistant cell line. *Exp. Hematol.*, 2004; 32: 375-381
- [87] Tian H., Zhang B., Di J., Jiang G., Chen F., Li H., Li L., Pei D., Zheng J.: Keap1: One stone kills three birds Nrf2, IKK β and Bcl-2/Bcl-xL. *Cancer Lett.*, 2012; 325: 26-34
- [88] Toki T., Itoh J., Kitazawa J., Arai K., Hatakeyama K., Akasaka J., Igarashi K., Nomura N., Yokoyama M., Yamamoto M., Ito E.: Human small Maf proteins form heterodimers with CNC family transcription factors and recognize the NF-E2 motif. *Oncogene*, 1997; 14: 1901-1910
- [89] Tomobe K., Shinozuka T., Kuroiwa M., Nomura Y.: Age-related changes of Nrf2 and phosphorylated GSK-3 β in a mouse model of accelerated aging (SAMP8). *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 2012; 54: e1-e7
- [90] Tong K.L., Katoh Y., Kusunoki H., Itoh K., Tanaka T., Yamamoto M.: Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol. Cell. Biol.*, 2006; 26: 2887-2900
- [91] Tong K.L., Kobayashi A., Katsuoka F., Yamamoto M.: Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol. Chem.*, 2006; 387: 1311-1320
- [92] Tufekci K.U., Civi Bayin E., Genc S., Genc K.: The Nrf2/ARE pathway: a promising target to counteract mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.*, 2011; 2011: 314082
- [93] Velichkova M., Guttman J., Warren C., Eng L., Kline K., Vogl A.W., Hasson T.: A human homologue of *Drosophila* kelch associates with myosin-VIIa in specialized adhesion junctions. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 2002; 51: 147-164
- [94] Vollrath V., Wielandt A.M., Iruretagoyena M., Chianale J.: Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. *Biochem. J.*, 2006; 395: 599-609
- [95] Wakabayashi N., Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kang M.I., Kobayashi A., Yamamoto M., Kensler T.W., Talalay P.: Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 2040-2045
- [96] Wakabayashi N., Itoh K., Wakabayashi J., Motohashi H., Noda S., Takahashi S., Imakado S., Kotsuji T., Otsuka F., Roop D.R., Harada T., Engel J.D., Yamamoto M.: Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat. Genet.*, 2003; 35: 238-245
- [97] Wang R., An J., Ji F., Jiao H., Sun H., Zhou D.: Hypermethylation of the Keap1 gene in human lung cancer cell lines and lung cancer tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 373: 151-154
- [98] Wang X.J., Hayes J.D., Henderson C.J., Wolf C.R.: Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 19589-19594
- [99] Wang X.J., Sun Z., Villeneuve N.F., Zhang S., Zhao F., Li Y., Chen W., Yi X., Zheng W., Wondrak G.T., Wong P.K., Zhang D.D.: Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis*, 2008; 29: 1235-1243
- [100] Wattenberg L.W.: Chemoprevention of cancer. *Cancer Res*, 1985; 45: 1-8
- [101] Xu C., Yuan X., Pan Z., Shen G., Kim J.H., Yu S., Khor T.O., Li W., Ma J., Kong A.N.: Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Mol. Cancer Ther.*, 2006; 5: 1918-1926
- [102] Xue F., Cooley L.: Kelch encodes a component of intracellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell*, 1993; 72: 681-693
- [103] Yamamoto T., Kyo M., Kamiya T., Tanaka T., Engel J.D., Motohashi H., Yamamoto M.: Predictive base substitution rules that determine the binding and transcriptional specificity of Maf recognition elements. *Genes Cells*, 2006; 11: 575-591
- [104] Zahreddine H., Borden K.L.: Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front. Pharmacol.*, 2013; 4: 28
- [105] Zhan L., Zhang H., Zhang Q., Woods C.G., Chen Y., Xue P., Dong J., Tokar E.J., Xu Y., Hou Y., Fu J., Yarrowborough K., Wang A., Qu W., Waalkes M.P., Andersen M.E., Pi J.: Regulatory role of KEAP1 and NRF2 in PPAR γ expression and chemoresistance in human non-small-cell lung carcinoma cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012; 53: 758-768
- [106] Zhang C., Su Z.Y., Khor T.O., Shu L., Kong A.N.: Sulforaphane enhances Nrf2 expression in prostate cancer TRAMP C1 cells through epigenetic regulation. *Biochem. Pharmacol.*, 2013; 85: 1398-1404
- [107] Zhang D.D., Hannink M.: Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 8137-8151
- [108] Zhang D.D., Lo S.C., Cross J.V., Templeton D.J., Hannink M.: Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 10941-10953
- [109] Zipper L.M., Mulcahy R.T.: The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 36544-36552

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.