

Received: 2014.01.26
Accepted: 2015.01.12
Published: 2015.07.06

Białka CNC w fizjologii i patologii

CNC proteins in physiology and pathology

Agnieszka Gęgotek, Elżbieta Skrzydlewska

Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Streszczenie

Do białek CNC zalicza się białka Bach1, Bach2 oraz cztery homologiczne czynniki transkrypcyjne: Nrf1, Nrf2, Nrf3 oraz p45NF-E2. Czynniki należące do tej grupy białek pełnią funkcje w ochronie komórek przed skutkami stresu oksydacyjnego. W warunkach fizjologicznych pozostają w postaci nieaktywnej w cytoplazmie lub ulegają degradacji. Natomiast w warunkach stresu oksydacyjnego ulegają translokacji do jądra komórkowego i przyłączają się do cząsteczki DNA w obszarze ARE. Dochodzi do transkrypcji genów kodujących cytoprotekcyjne białka, takie jak enzymy II fazy lub niskocząsteczkowe białka antyoksydacyjne (tj. tioredoksyna, ferrytyna, metalotioneiny) odpowiedzialne za ochronę komórki przed reaktywnymi formami tlenu (RFT). Aktywność transkrypcyjna tych białek zależy bezpośrednio od stanu redoks komórki. RFT jako wtórne przekaźniki sygnałów hamują cytoplazmatyczne inhibitory białek CNC, a także nasilają aktywność kinaz (MAPK, PKC, PI3K, PERK), prowadząc do fosforylacji czynników transkrypcyjnych. Sprzyja to ich translokacji do jądra komórkowego i tworzeniu kompleksów inicjujących ekspresję genów. Zaburzenia regulacji aktywności czynników transkrypcyjnych należących do białek CNC wywołane mutacjami genów, modyfikacjami epigenetycznymi, czy też zwiększoną aktywnością białek p62, p21 lub onkogenów k-Ras, B-Raf i c-Myc wywołują zmiany w poziomie ekspresji genów zależnych od ARE, co może prowadzić nawet do procesu kancerogenezy. Czynniki transkrypcyjne Nrf indukując ekspresję antyoksydantów oraz enzymów odpowiedzialnych za detoksykację ksenobiotyków mogą być rozpatrywane jako potencjalny cel oddziaływania czynników chemioprewencyjnych w terapii przeciwnowotworowej.

Słowa kluczowe:

białka CNC • czynniki transkrypcyjne Nrf • ekspresja białek • reaktywne formy tlenu • antyoksydanty

Summary

CNC proteins consist of Bach1, Bach2 and 4 homologous transcription factors: Nrf1, Nrf2, Nrf3 and p45NF-E2. Transcription factors belonging to this group of proteins play a crucial role in protection of cells against oxidative stress. Under physiological conditions, they remain in the cytoplasm in the inactive form or are degraded. However, in oxidative stress conditions, they are translocated to the nucleus, and bind to DNA in the ARE sequence. Consequently, there is transcription of genes encoding cytoprotective proteins, such as phase II enzymes, or low molecular weight antioxidant proteins (i.e., thioredoxin, ferritin, metallothionein) responsible for protecting cells from reactive oxygen species (ROS) action. The activity of transcriptional proteins depends directly on the redox state of the cell. ROS as second messenger signals, control inhibitors of cytoplasmic CNC proteins or potentiate the activity of kinases (MAPK, PKC, PI3K, PERK), leading to phosphorylation of transcription factors. This is conducive to translocation of these molecules into the nucleus and to formation of complexes that initiate the gene expression. Disorders of regulation of the activity of transcription factors belonging to

	the CNC proteins caused by gene mutations, epigenetic modifications or increased activity of p62, p21, or k-Ras, B-Raf and c-Myc oncogenes, induce changes in the level of ARE-dependent gene expression, which can lead even to the development of carcinogenesis. On the other hand, Nrf transcription factors, inducing the expression of antioxidants and enzymes responsible for the detoxification of xenobiotics, can be considered as a potential target of the action of chemopreventive factors in anticancer therapy.
Key words:	CNC proteins • Nrf transcription factors • protein expression • reactive oxygen species • antioxidants
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1160360
Word count:	4453
Tables:	–
Figures:	6
References:	109

Adres autorki: mgr Agnieszka Gęgotek, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. A. Mickiewicza 2D; 15-222 Białystok; e-mail: agnieszka.gegotek@umb.edu.pl

Wykaz skrótów: **4-HNE** – 4-hydroksynonenal; **AP-1** – kompleks białkowy aktywujący transkrypcję (activator protein 1); **ARE** – element odpowiedzi antyoksydacyjnej (antioxidant response element); **Bach1/2** – białko z rodziny CNC (BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1/2); **Bcl-2** – białko antyapoptotyczne (B-cell lymphoma 2); **BTB** – białkowa domena odpowiedzialna za tworzenie kompleksów (broad complex, tramtrack and bric-à-brac); **bZIP** – białkowy motyw zamka leucynowego; **c-Myc** – białko transkrypcyjne; **CAT** – katalaza; **CREBP** – białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cykliczny AMP (cAMP response element-binding protein); **CNC** – rodzina białek „cap’n’collar”; **CTR** – białkowa domena C-terminalna; **DGR** – białkowa domena zawierająca wiele reszt glicyny; **EPHX** – hydrolaza epoksydowa; **Fos** – czynnik transkrypcyjny; **Fyn** – kinaza białkowa; **GCL** – ligaza γ-glutamylcysteiny; **GCV** – Glacyklovir; **GST** – S-transferaza glutationowa; **GR** – reduktaza glutationowa; **HO-1** – oksygenaza hemowa 1; **IKKβ** – kinaza 2 inhibitora NF-κB; **IVR** – białkowa domena odpowiedzialna za transaktywację; **Jun** – podjednostki czynnika transkrypcyjnego AP-1; **KAP1** – białko transkrypcyjne; **Keap1 (INrf2)** – białko inhibitorowe Nrf2 (Kleish-like ECH associating protein 1); **MDA** – dialdehyd malonowy; **MT1/2** – metalotioneiny 1/2; **NES** – region białka odpowiedzialny za jego translokację (nuclear export signal); **NF-κB** – czynnik transkrypcyjny; **NFE2L2** – czynnik transkrypcyjny z rodziny CNC; **NLS** – region białka odpowiedzialny za jego umiejscowienie (nuclear localization signal); **NQO1** – oksydoreduktaza NAD(P)H:ubichinon 1; **Nrf 1/2/3** – czynniki transkrypcyjne z rodziny CNC (nuclear respiratory factor 1/2/3); **NTR** – białkowa domena N-terminalna; **p45NF-E2** – czynnik transkrypcyjny z rodziny CNC (nuclear factor (erythroid-derived 2) protein 45); **Src** – kinaza białkowa; **RFA** – reaktywne formy azotu; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa; **TK** – kinaza tymidynowa; **TRIM** – rodzina czynników transkrypcyjnych; **TrxR** – reduktaza tioredoksyny; **UGT** – UDP-glukuronylottransferaza.

WPROWADZENIE

Prawidłowe funkcjonowanie każdej komórki wymaga ścisłej kontroli procesów metabolicznych, w tym również przekazywania sygnałów z otoczenia. Transdukcja sygnałów może wywołać zarówno szybką, jak i późną reakcję komórki na zaistniały bodziec. W przypadku szybkiej reakcji na powstające zmiany, w cytoplazmie dochodzi do krótkotrwałych zmian aktywności poszczególnych składników metabolicznych. Reakcja późna jest związana z biosyntezą nowych związków, co jest czaso- i energochłonne, ale zapewnia długotrwałą i skuteczną odpowiedź na zaistniały bodziec. Taka reakcja komórki wydaje się szczególnie istotna, zwłaszcza

w przypadku odpowiedzi na zmiany równowagi oksydoredukcyjnej i powstawanie stresu oksydacyjnego. Istotną rolę w odpowiedzi na stres oksydacyjny pełnią białka regulatorowe należące do grupy czynników transkrypcyjnych. Uważa się, że jedną z najbardziej wyspecjalizowanych i kompleksowo chroniących przed stresem oksydacyjnym komórki grupą białek odpowiedzialnych za odbieranie i transdukcję sygnałów do nasilenia lub zahamowania biosyntezy białek o działaniu antyoksydacyjnym są czynniki transkrypcyjne z rodziny „cap’n’collar” (CNC).

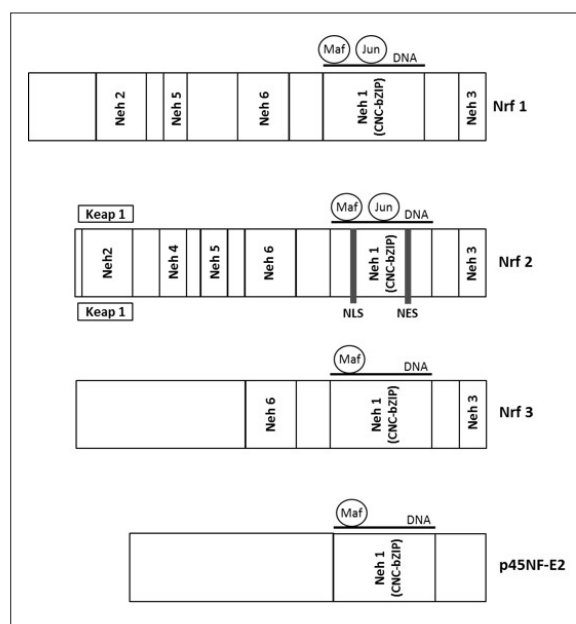
Białka z rodziny „cap’n’collar” (CNC) zawierają w swojej strukturze motyw tzw. zamka leucynowego (bZIP,

basic leucine zipper). Jest to trójwymiarowa struktura, w której skład wchodzi α helisy bogate w reszty leucyny, które występują w przybliżeniu, co 7 reszt aminokwasowych. Układ tworzy amfifilową helisę z obszarem hydrofobowym, który umożliwia tworzenie dimeru z innym białkiem zawierającym domenę bZIP. Rodzina czynników transkrypcyjnych z domeną bZIP oprócz zamka leucynowego zawiera obszar zasadowy, który przez wiązania wodorowe wiąże się z dużą bruzdą DNA [49].

Do białek CNC zalicza się białko Bach1 (BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1) i Bach2 (BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2) [70,95] oraz cztery homologiczne czynniki transkrypcyjne uczestniczące w ochronie komórki przed stresem oksydacyjnym. Do czynników transkrypcyjnych należą białka Nrf1, Nrf2, Nrf3 oraz p45NF-E2 [4,46,63]. Ich masy cząsteczkowe wynoszą 66-73 kDa, a w ich budowie (w zależności od rodzaju białka) wyróżnia się do sześć istotnych domen odpowiadających za różne funkcje:

- domena Neh1 zawiera fragment bZIP, który pozwala na heterodimeryzację cząsteczki z małym białkiem Maf w jądrze komórkowym, a jednocześnie odpowiada za przyłączanie Nrf do cząsteczki DNA oraz dzięki regionom NLS (nuclear localization signal) i NES (nuclear export signal) bierze udział w translokacji Nrf w obrębie komórki;
- Neh2 jest domeną N-terminalną zawierającą siedem reszt lizyny, które mogą ulegać ubikwitinacji i pozwalającą na wiązanie białka Nrf2 do jego represora w cytosolu – białka Keap1 i dlatego jest nazywana negatywnym regulatorem Nrf2;
- Neh3 jest domeną C-terminalną, która uczestniczy w stabilizacji białka Nrf1 i Nrf2 i może działać jako domena transaktywacyjna oraz brać udział w interakcji z innymi komponentami podczas procesu transkrypcji;
- domeny Neh4 i Neh5 są obszarami kwasowymi, które mogą przyłączać białko CREBP (cAMP response element binding protein), mające aktywność acetylohydroksylazy histonowej, które działają jako transaktywator;
- domena Neh6 jest bogata w serynę i uczestniczy w procesie proteolizy białek Nrf (ryc. 1) [78].

W warunkach fizjologicznych białka CNC są umiejscowione w cytoplazmie komórki w postaci nieaktywnych kompleksów z ich inhibitorami, natomiast po aktywacji przemieszczają się do jądra komórkowego. Tam tworzą heterodimery z innymi białkami zawierającymi sekwencję homologiczną do sekwencji zamka leucynowego. Tak powstałe kompleksy przyłączają się do cząsteczki DNA w sekwencji ARE (antioxidant responsive element) nazywanej także EpRE (electrophile response elements) o charakterystycznej sekwencji 5'-TGACnnnGCA-3' i inicjują transkrypcję genów [44].

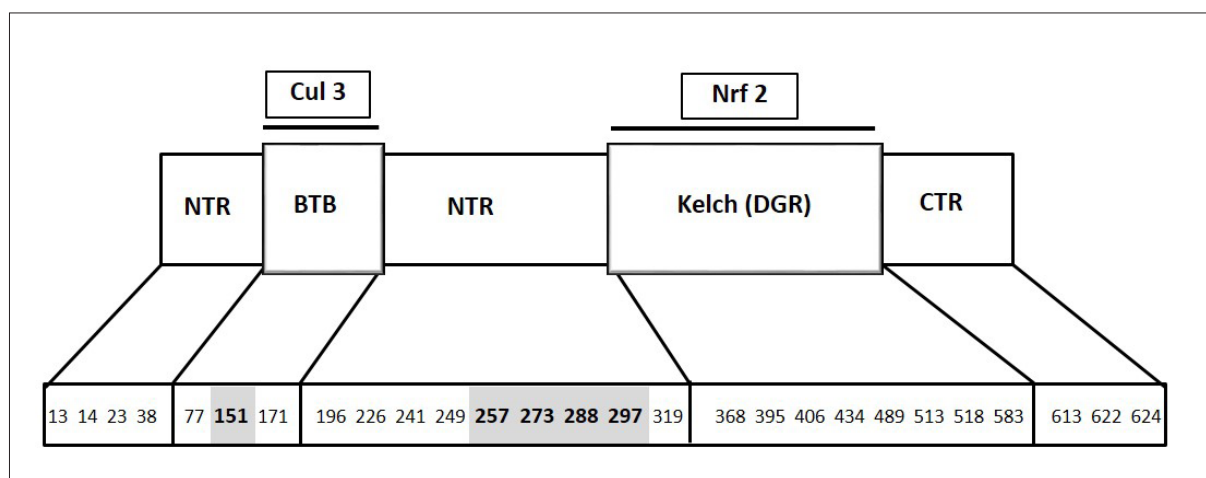


Ryc. 1. Budowa białek z rodziny cap'n/collar (CNC)

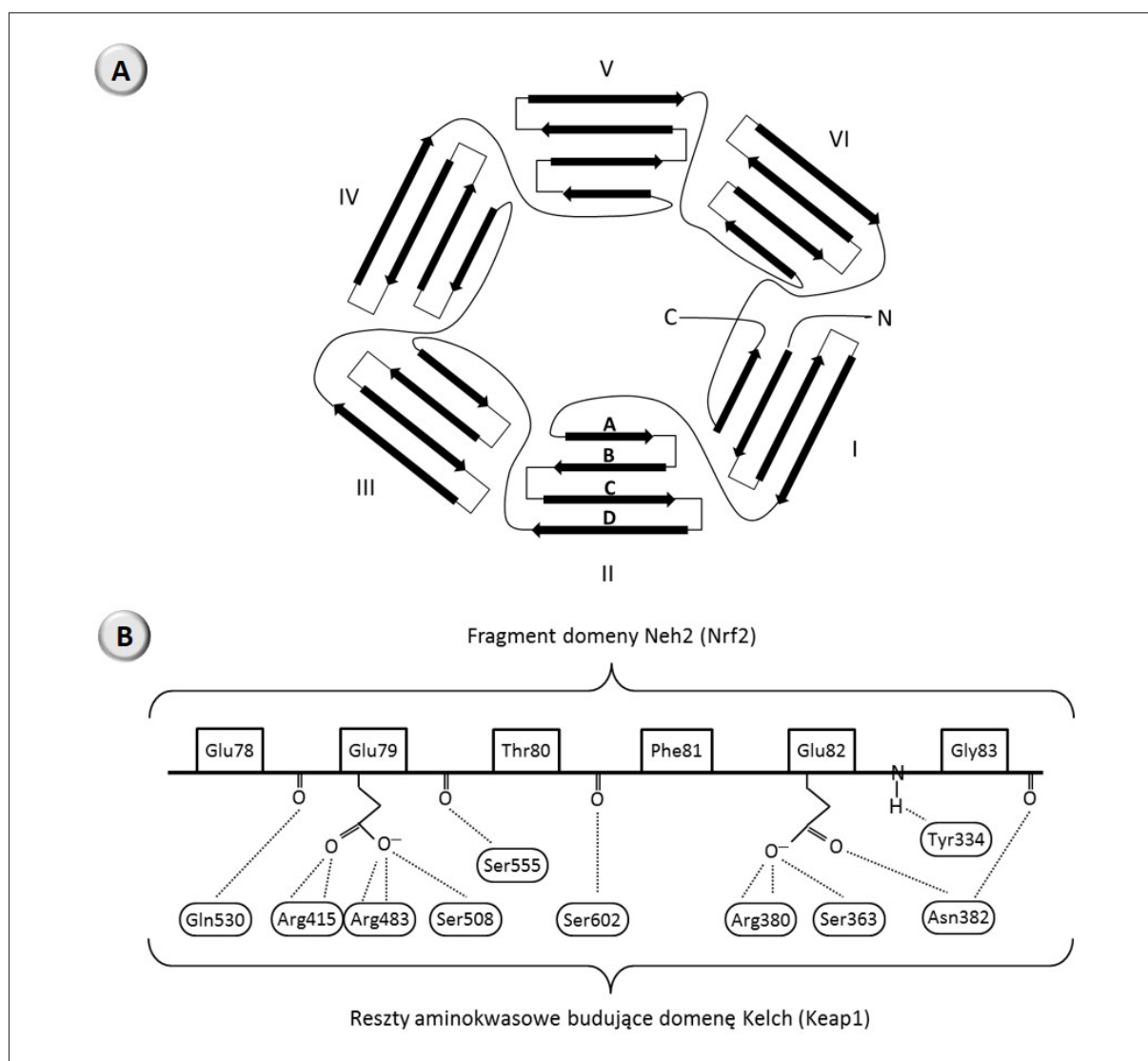
CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY Nrf2

Jednym z najdokładniej zbadanych i opisanych składników rodziny CNC jest białko Nrf2 (nuclear erythroid 2-related factor), nazywane także czynnikiem NFE2L2 (nuclear factor erythroid-derived 2-like 2). Jest wewnątrzkomórkowym czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za transkrypcję genów enzymów antyoksydacyjnych, takich jak katalaza czy oksygenaza hemowa 1 [109]. W organizmie człowieka Nrf2 jest kodowany przez gen *NFE2L2*, który ulega transkrypcji we wszystkich tkankach [63]. Nrf2 człowieka składa się z 589 aminokwasów i jest o 8 aminokwasów krótszy niż Nrf2 myszy [63]. Czynniki Nrf2 zawierają wszystkie domeny możliwe dla tego typu białek [Neh1- Neh6] [78]. W warunkach fizjologicznych Nrf2 jest umiejscowiony głównie w cytosolu w postaci nieaktywnego kompleksu z białkiem Keap1 (Kleth-like ECH associating protein 1) [47]. Keap1 (określane także jako Inrf2) jest białkiem regulatorowym Nrf2, które wiążąc się w kompleks z tym czynnikiem transkrypcyjnym hamuje jego aktywność oraz koordynuje proces jego ubikwitinacji i proteolitycznej degradacji [27].

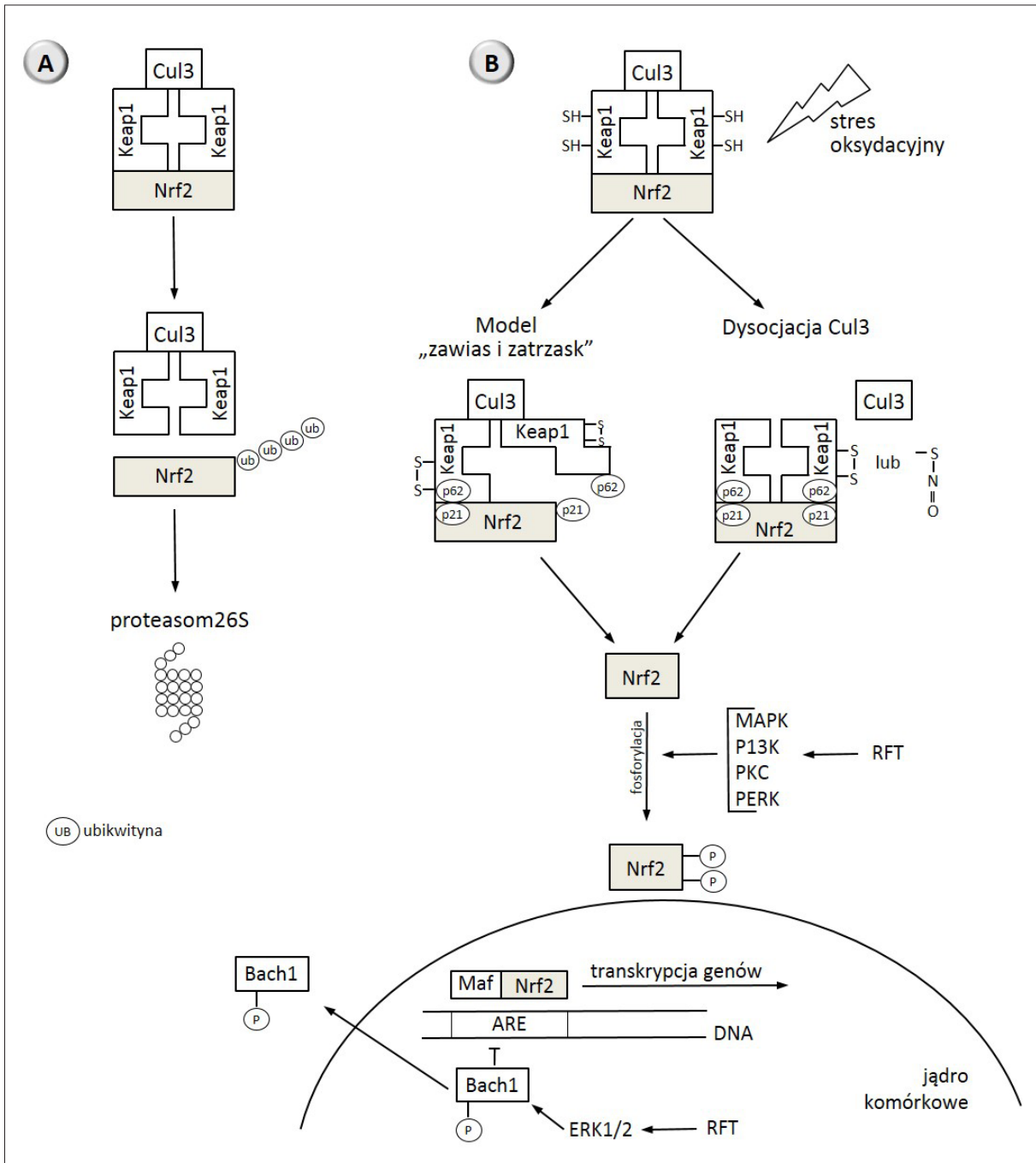
W cząsteczce Keap1 wyróżnia się pięć istotnych domen: N-terminalną (NTR), BTB (broad complex, tramtrack and bric-à-brac) zawierającą najbardziej podatną na oksydacyjne modyfikacje cysteinę 151, IVR (intervening region), Kelch oraz C-terminalną domenę (CTR). Domena BTB jest miejscem przyłączenia białka Cul3, natomiast domena IVR zawiera cysteiny w pozycji 273 oraz 288, które ulegając utlenieniu powodują zmianę konformacji białka. Domena Kelch zawierająca fragment DGR (double glycine repeat) wiąże Nrf2 i jest odpowiedzialna, przez oddziaływanie z aktywną lub mrozozywną, za przyłączanie całego kompleksu do cytoszkieletu [58] (ryc. 2).



Ryc. 2. Budowa białka Keap1 z zaznaczeniem podłoża reszt cysteinowych w łańcuchu aminokwasowym. Najbardziej podatne na stres oksydacyjny cysteiny mają pozycje: 151, 257, 273, 288 oraz 297



Ryc. 3. Schemat budowy domeny Kelch białka Keap1 z zaznaczonymi motywami I-VI i β -strukturami A-D (A) oraz interakcje między białkami Nrf2 (domeną Neh1) a Keap1 (domeną Kelch) (B)



Ryc. 4. Mechanizmy hamowania/degradacji (A) i aktywacji czynnika Nrf2 (B)

Łańcuch polipeptydowy Keap1 tworzy płytką kieszeń do wiązania łańcucha polipeptydowego Nrf2, w której budowie wyróżnia się sześć elementów, a każdy z nich składa się z czterech fragmentów β -struktury. W tak utworzoną kieszeń peptydową wsuwa się krótki odcinek Nrf2 nazywany β -spinką. Szacuje się, że między Nrf2 a Keap1 powstaje 13 oddziaływań międzycząsteczkowych, jednak jedynie dwie spośród obecnych w łańcuchu Nrf2 reszt glutaminianowych (Gln79 i Gln82) biorą udział w wiązaniu Nrf2 do Keap1. Pozostałe interakcje zachodzą między

aminokwasami Keap1 budującymi domenę Kelch, a atomami tlenu lub azotu tworzącymi wiązania peptydowe w łańcuchu Nrf2 [58]. Strukturę domeny Kelch oraz interakcje między Kelch i Neh1 przedstawia ryc. 3.

Jedną z charakterystycznych cech Keap1 jest obecność w sekwencji złożonej z 624 aminokwasów 27 reszt cysteinyowych, z których najbardziej reaktywnymi resztami cysteiny są reszty Cys257, Cys273, Cys288 i Cys297 [15]. W warunkach fizjologicznych geny odpowiedzialne za

syntezę białka Nrf2 podlegającą ciągłej ekspresji, dlatego aby poziom tego czynnika w cytoplazmie był stały białko Keap1 tworzy homodimer wiążący się z białkiem Cul3 w kompleks, który może przyłączać cząsteczkę Nrf2 [83]. Domena DGR Keap1 bogata w glicynę wiążąc się z domeną Neh2 białka Nrf2 umożliwia Cul3 ubikwitynację Nrf2, jego oddysocjowanie oraz degradację w tempie zapobiegającym gromadzeniu się w komórce (ryc. 4A) [100]. W warunkach fizjologicznych okres półtrwania czynnika Nrf2 w cytoplazmie nie jest dłuższy niż 15-20 min, po czym dochodzi do poliubikwitynacji, a następnie do degradacji przez proteasom 26S [50].

W wyniku stresu oksydacyjnego dochodzi do utlenienia reszt cysteinyliowych na powierzchni Keap1, czego następstwem są zmiany w konformacji tego białka, powodujące uwolnienie czynnika Nrf2 z kompleksu [34]. Dokładny mechanizm uwolnienia Nrf2 z kompleksu Nrf2-Keap1 nie jest jeszcze jednoznacznie poznany. Obecnie bierze się pod uwagę dwie hipotezy przebiegu tego procesu. Pierwszy model - „zawias i zatrzask” („hinge and latch”) zakłada, że utlenienie grup tiolowych regionu IVR białka Keap1 (głównie Cys273 i Cys288) wywołując zmiany w konformacji Keap1 zaburza interakcję Keap1-Nrf2, co uniemożliwia poliubikwitynację Nrf2 i prowadzi do oddysocjowania aktywnego czynnika transkrypcyjnego z kompleksu. Jednocześnie modyfikacje w strukturze kompleksu zmieniają substrat Cul3. Cząsteczka przestaje przyłączać ubikwitynę do czynnika Nrf2 i rozpoczyna ubikwitynację Keap1 w pozycji lizyny 298, co prowadzi do proteasomalnej degradacji tego białka [22]. Drugi model przyjmuje, że utlenienie grup tiolowych białka Keap1 (głównie Cys151) powoduje oddysocjowanie białka Cul3 z kompleksu, co uniemożliwia ubikwitynację Nrf2. W wyniku zaistniałej sytuacji zarówno uwolnione z kompleksu, jak i nowo syntetyzowane cząsteczki Nrf2 mogą ulegać translokacji bezpośrednio do jądra komórkowego (ryc. 4B) [89].

Mechanizm regulacji wiązania Nrf2 do Keap1 obejmuje także S-nitrozylację cystein w cząsteczce Keap1. Taka modyfikacja reszt cysteinyliowych wywołuje zmiany konformacji Keap1 i oddysocjowanie aktywnego Nrf2. Najczęstszą przyczyną S-nitrozylacji Keap1 jest pojawiający się w komórce jako cząsteczka sygnałowa tlenek azotu, który aktywując Nrf2 wykazuje działanie cytoprotekcyjne [90].

Utlenienie grup tiolowych białka Keap1 oraz związana z tym zmiana konformacji tego białka może spowodować również przyłączenie do kompleksu Keap1-Nrf2 dodatkowych białek, takich jak p21 i p62, które zmniejszając stabilność kompleksu prowadzą do oddysocjowania Nrf2 [50] (ryc. 5). W wyniku zmiany konformacji Keap1 białko p21 może się przyłączyć bezpośrednio do czynnika Nrf2 w domenie Neh2, która odpowiada za tworzenie kompleksu z Keap1. Zablokowanie tej domeny przez p21 powoduje oddysocjowanie Nrf2 z kompleksu, a w przypadku wolnych cząsteczek Nrf2 zapobiega powtórному wiązaniu w kompleks z inhibitorem [8]. Ponadto zmiana konformacji Keap1 umożliwia białku p62 przyłączenie się do domeny DGR w Keap1, blokując to miejsce i tym sa-

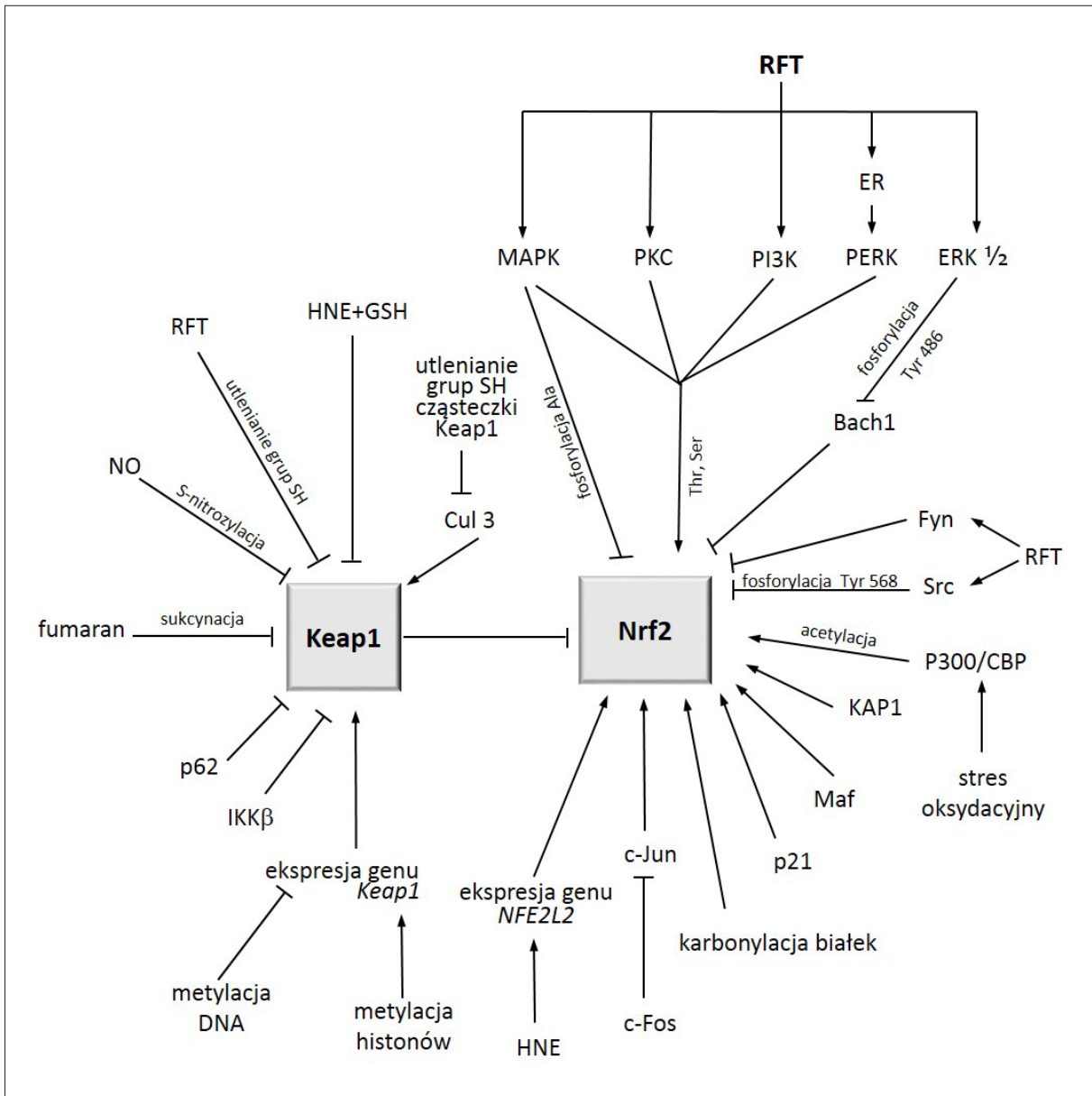
mym zapobiegając tworzeniu kompleksu Nrf2-Keap1 [31]. W cytoplazmie, Keap1 może także wiązać inne niż Nrf2 białka. Przykładem takiego białka jest IKK β ; cząsteczka ta w kompleksie z Keap1 staje się nieaktywna i na skutek tego nie dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [57]. W ten sposób Keap1 reguluje inny szlak sygnalizacyjny niezależny od Nrf2, w którym cząsteczka IKK β może blokować inhibitorową aktywność Keap1 [40]. Wykazano także, że w cytoplazmie Keap1 może przyłączać cząsteczkę protymozyny α w sposób analogiczny do wiązania Nrf2, jednak znaczenie powstającego kompleksu nie jest jeszcze dokładnie zbadane [68].

Oddysocjowane z kompleksu białko Nrf2 ulega translokacji do jądra, gdzie przyłączając małe białko Maf tworzy kompleks preinicjacyjny zdolny do przyłączenia się do DNA w regionach ARE. Pobudza to transkrypcję genów kodujących białka antyoksydacyjne.

Regulacja aktywności transkrypcyjnej Nrf2

Szybkość przemieszczania się do jądra oraz aktywność transkrypcyjna Nrf2 zależą od stopnia ufosforylowania tego białka, co uwarunkowane jest aktywnością kinaz biorących udział w przekazywaniu sygnałów w komórce, takich jak kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny (MAPK) [102], kinazy białkowe C (PKC) [24], 3-kinaza fosfatydylinozytolu (PI3K) [59] lub kinaza białkowa umiejscowiona w retikulum endoplazmatycznym (PERK) [12] (ryc. 5). Wykazano, że fosforylacja reszt treoniny i seryny zwiększa aktywność Nrf2, natomiast fosforylacja reszt alaniny, powoduje obniżenie aktywności i prowadzi do proteolizy tego białka [51]. Substratem kinazy PKC jest najczęściej Ser40 umiejscowiona w domenie Neh2 białka Nrf2, która wchodzi w interakcję z Keap1 [66]. Wykazano również udział PI3K (kinazy lipidowej kontrolującej wzrost, różnicowanie i apoptozę komórek) w regulacji zależnych od sekwencji ARE genów oksydazy hemowej (HO-1). Hamowanie kinazy PI3K wywołuje znaczne obniżenie aktywności Nrf2, a co za tym idzie poziom HO-1 [42]. Natomiast kinaza PERK odbiera sygnał o stresie oksydacyjnym z siateczki cytoplazmatycznej i w konsekwencji hamuje cykl komórkowy i przez fosforylację Nrf2 prowadzi do oddysocjowania Nrf2 od Keap1. Fosforylacja przez kinazę PERK nasila transport Nrf2 do jądra komórkowego [52]. Natomiast obecne w jądrze kinazy tyrozynowe Src oraz Fyn odpowiadają za fosforylację tyrozyny w pozycji 568 cząsteczki Nrf2, co powoduje usunięcie Nrf2 z jądra powodując ponowne związanie go w cytoplazmie z Keap1 oraz zahamowanie transkrypcji genów [30,67] (ryc. 5).

Aktywność Nrf2 zależy także od stopnia acetylacji tego białka. Badania *in vitro* przeprowadzone na linii embrionalnych komórek ludzkiej nerki (HEK293) wskazują, że w wyniku stresu oksydacyjnego wywołanego arsenem uaktywnia acetyltransferazę p300/CBP. Jej aktywność powoduje przyłączenie grupy acetylowej do reszt lizyliowych Nrf2 w domenie Neh1. Zwiększa to zarówno szybkość przemieszczania się wolnego czynnika do jądra, jak i siłę jego wiązania do DNA oraz aktywność transkrypcyjną wybra-



Ryc. 5. Czynniki wpływające na aktywność Nrf2

nych genów [84]. W przypadku komórek szpiku kostnego od osób ze stwierdzoną białaczką (komórki linii K562) deacetylacja Nrf2 powoduje jego usuwanie z jądra [38] (ryc. 5).

Aktywność Nrf2 może być również regulowana na poziomie ekspresji tego czynnika lub białka Keap1 [64]. Zmiany epigenetyczne, takie jak metylacja DNA lub białek histonowych wpływają na poziom Nrf2 lub jego inhibitora Keap1 w cytoplazmie [103] (ryc. 5). Przyłączenie grupy metylowej do cząsteczki DNA zawierającej gen *Keap1*, a zwłaszcza do odcinka promotorowego obniża aktywność transkrypcyjną tego genu, a przez to zmniejsza również poziom Keap1 w cytoplazmie [17]. Natomiast metylacja rdzeniowych białek histonowych zazwyczaj podnosi poziom transkrypcji wybranych genów [18].

Niezależnie od powyższych przyczyn aktywność transkrypcyjna Nrf2 może ulec również podwyższeniu w wyniku przyłączenia się do Nrf2 cząsteczki białka KAP1 (KRAB-associated protein 1), które jest zaliczane do czynników transkrypcyjnych (wraz z czynnikami TIF1 α , γ i δ) z rodziny TRIM (tripartite motif family) [61] (ryc. 5). W warunkach fizjologicznych bierze udział w przekazywaniu sygnału od czynników wzrostu komórki do jądra komórkowego przez tworzenie kompleksów transkrypcyjnych zdolnych do wiązania DNA [81]. W przypadku zaburzeń biosyntezy KAP1 w czasie rozwoju myszy, odnotowano obumieranie ich zarodków we wczesnych stadiach [19]. Samo białko KAP1 nie ma w budowie domeny wiążącej DNA, jednak jego przyłączenie do Nrf2 podwyższa aktywność transkrypcyjną tej cząsteczki. W tak utworzo-

nym kompleksie KAP1 nie bierze bezpośredniego udziału w procesach ekspresji genów, wpływa jedynie na przyłączanie Nrf2 do DNA [23].

Po oddysocjowaniu Nrf2 z kompleksu z Keap1, białko to nie pozostaje bez wpływu na aktywność transkrypcyjną Nrf2. Szacuje się, że prawie 5% białka Keap1 w komórce jest umiejscowiona w jądrze komórkowym zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i podczas stresu oksydacyjnego. Wskazuje to na możliwość przemieszczania się tego białka z cytoplazmy do jądra komórkowego bez względu na stan fizjologiczny komórki [68]. Keap1 w jądrze komórkowym ma także możliwość wiązania i inhibicji cząsteczki Nrf2, jednak tylko wtedy, kiedy nie jest ono połączone w dimer z białkiem Maf [92].

Aby rozpocząć działania transkrypcyjne w jądrze białko Nrf2 przyłącza małe białko Maf tworząc kompleks zdolny do przyłączenia się do sekwencji ARE w cząsteczce DNA [44]. W warunkach fizjologicznych o utworzenie heterodimeru z małym białkiem Maf w jądrze komórkowym konkuruje z Nrf2 białko Bach1, które może się również wiązać do sekwencji ARE zapobiegając nadmiernej ekspresji genów regulowanych przez Nrf2 [14]. Aktywowana w warunkach stresu oksydacyjnego kinaza ERK1/2, po translokacji do jądra komórkowego, fosforyluje białko Bach1 [85]. Jeśli zostanie ufosforylowana reszta Tyr486, wówczas cząsteczka Bach1 odłącza się od sekwencji ARE i jest transportowana do cytoplazmy, umożliwiając tym samym przyłączenie czynnika Nrf2 do DNA [37]. Nrf2 w jądrze komórkowym może także heterodimerizować z białkami należącymi do rodziny Jun (c-Jun, Jun-B, Jun-D) [55,62]. Białka te mogą się również przyłączać do DNA i są zdolne do indukcji transkrypcji genów. Badania na komórkach nowotworu wątroby HepG2 wskazują, że nadekspresja Nrf2 lub białka c-Jun powoduje odpowiednio sześciokrotny lub trzykrotny wzrost ekspresji genów kodujących białka antyoksydacyjne, natomiast jednoczesna nadekspresja białek Nrf2 i c-Jun w badanych komórkach prowadzi do szesnastokrotnego wzrostu ekspresji tych samych genów [32]. Inne badania wykazują, że konkurencyjne wiązanie c-Jun w kompleksy z innym niż Nrf2 białkiem (np. c-Fos) obniża aktywność Nrf2 [93]. W przypadku komórek wątroby szczura z wyciszonym genem Nrf2 zauważono obniżone stężenie białek c-Jun [101] (ryc. 5).

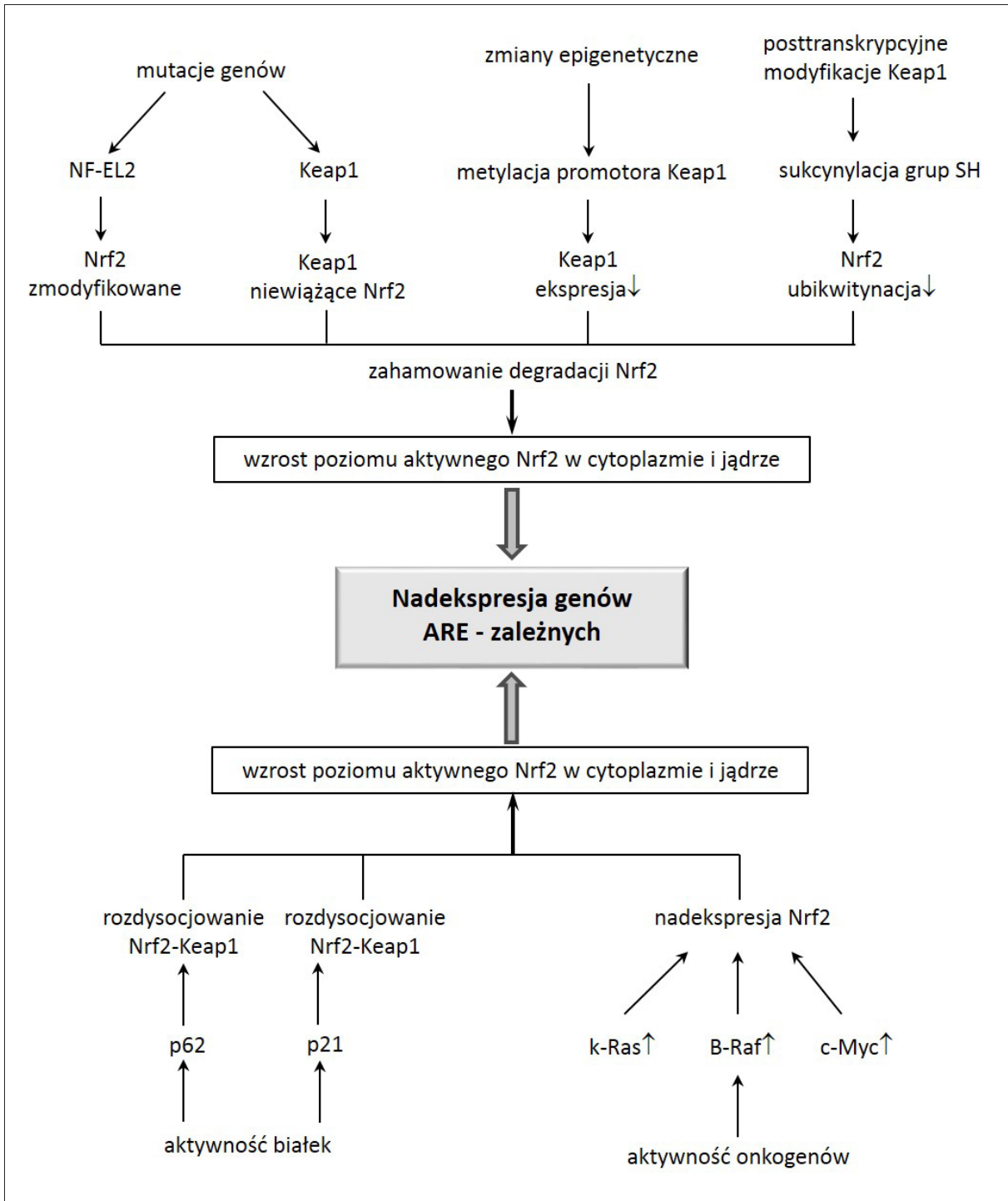
Nrf2 przyłącza się do DNA w regionach ARE [44] i pobudza transkrypcję genów kodujących białka antyoksydacyjne (przede wszystkim enzymów II fazy, takich jak: S-transferaza glutationowa (GST), oksydoreduktaza NAD(P)H: ubichinon 1 (NQO1), UDP-glukuronylotransferaza (UGT), hydrolaza epoksydowa (EPHX), ligaza γ -glutamylcysteiny (GCL), oksygenaza hemowa 1 (HO-1), reduktaza glutationowa (GR), reduktaza tioredoksyny (TrxR), katalaza (CAT) i dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) [109]). Przypuszcza się również, że Nrf2 aktywuje transkrypcję genów pozostałych białek antyoksydacyjnych, które zawierają w swojej strukturze sekwencję ARE (np. tioredoksyna, ferrytyna) [20,77]. Oprócz funkcji transkrypcji białek antyoksydacyjnych, Nrf2 działa cytoprotekcyjnie wpływając stymulu-

jąc na poziom i aktywność białek antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2 [69].

Ponieważ Nrf2 reguluje ekspresję genów kodujących białka o działaniu cytoprotekcyjnym, deaktywujących elektrofilowe metabolity, stabilizującym potencjał oksydoredukcyjny komórki [6,75], regulator jego aktywności transkrypcyjnej - białko Keap1 odpowiada jednocześnie za stopień nasilenia stresu oksydacyjnego w komórce. Jednym ze skutków stresu oksydacyjnego jest peroksydacja fosfolipidów błonowych. W jej następstwie powstaje wiele produktów, w tym reaktywnych aldehydów o małych masach cząsteczkowych, głównie 4-HNE i MDA [80]. Związki te łatwo wchodzi w reakcje z cząsteczkami nukleofilowymi, takimi jak związki sulfhydrylowe. Powstają wtedy koniugaty glutation-HNE, co się przyczynia do obniżenia poziomu podstawowego antyoksydantu nieenzymatycznego w komórce. Prowadzi to do powstania stresu oksydacyjnego i utlenienia grup sulfhydrylowych reszt cysteiny, co sprzyja modyfikacji struktury białka Keap1 i oddysocjowania Nrf2, jak stwierdzono w przypadku komórek ludzkiego śródbłonka naczyniowego linii HUVEC [10]. Odpowiedź Nrf2 na podwyższone stężenie 4-HNE jest uzależniona od wieku zwierząt. W komórkach mięśni gładkich wyizolowanych z naczyń krwionośnych pochodzących od młodych (~13-letnich) małp stwierdzono, że podwyższeniu stężenia 4-HNE odpowiada aktywacja Nrf2 i rozpoczęcie transkrypcji enzymów II fazy, natomiast w komórkach pochodzących od zwierząt starszych (~21-letnich) nie obserwuje się takiej reakcji - nie wzrasta ani aktywność ani poziom ekspresji Nrf2 [91]. Uważa się również, że aktywując Nrf2 4-HNE może odgrywać nową rolę w działaniach protekcyjnych komórki. Badania na pacjentach z chorobami serca, wskazują, że podwyższenie stężenia 4-HNE, a co za tym idzie aktywacja Nrf2 obniża ryzyko niedokrwienia i reperfuzji serca [108].

Innym następstwem stresu oksydacyjnego jest kumulacja karbonylowanych białek w komórce. Sugeruje się istnienie zależności między wzrostem aktywności Nrf2 a dużym stężeniem karbonylowanych białek [86]. Jednak dokładny mechanizm opisujący wpływ karbonylacji białek na dysocjację i translokację Nrf2 do jądra komórkowego nie został jeszcze dokładnie poznany.

O dużym znaczeniu regulacji transkrypcji genów przez Nrf2 świadczą wyniki przeprowadzonych badań na zwierzętach z wyciszonymi genami lub nadekspresją białek Nrf2 lub Keap1. Wykazano, że nadekspresja Keap1 (np. w ludzkich osteoklastach) zmniejsza odporność organizmu na stres oksydacyjny i może osłabić struktury kości oraz jej podatność na uszkodzenia [35]. Eksperymenty na myszach pozbawionych genu Nrf2 (*nrf2*^{-/-}) wskazują, że zwierzęta te mają zwiększoną podatność na czynniki cytotoksyczne i genotoksyczne w stosunku do myszy typu dzikiego, co jest spowodowane obniżoną ekspresją m.in. GST, NQO1 [41,104]. Wyciszenie genu *NFE2L2* w astrocytach ogranicza neuroprotektoryjne działanie tych komórek, degradując neurony. W organizmie myszy *nrf2*^{-/-} dochodzi również do rozwoju leukoencefalopatii naczyniowej,



Ryc. 6. Mechanizmy aktywacji Nrf2 w komórkach nowotworowych

zmian zapalnych w wątrobie i nerkach oraz dysfunkcji komórek głównych obszarów mózgu [25]. U takich myszy zaobserwowano także częstsze niż u myszy typu dzikiego przypadki stwardnienia rozsianego [56]. Eksperymenty na myszach z wyciszonym genem *Keap1* wskazują jak istotną rolę ma hamowanie aktywności Nrf2. Brak inhibitora Nrf2 i ciągła aktywność transkrypcyjna prowadzi u tych zwierząt do hiperkeratyzacji, a następnie do niedroż-

ności przełyku i żołądka, co powoduje śmierć w przeciągu 3 tygodni od narodzenia [7].

Udział Nrf2 w procesie kancerogenezy oraz farmakoterapii

Za jedną z przyczyn kancerogenezy uważa się permanentny stres oksydacyjny i związane z tym niekontrolowane

oksydacyjne modyfikacje składników komórki, w tym także kwasy nukleinowe. Mutacje w genach regulujących komórkową homeostazę, a przede wszystkim onkogenach, genach supresorowych i genach regulujących apoptozę mogą prowadzić do inicjacji procesu kancerogenezy lub konwersji niezłośliwych guzów w postaci złośliwe [45]. W warunkach stresu oksydacyjnego RFT/RFA modyfikuje składniki komórki zmienionej nowotworowo przyczyniając się do podwyższenia aktywności Nrf2, co powoduje odporność na stres oksydacyjny i dużą lekooporność tych komórek [60].

Stwierdzono, że w procesie kancerogenezy zmienia się aktywność Nrf2 zarówno z powodu modyfikacji samej cząsteczki Nrf2 jak i jej inhibitora - białka Keap1. W przypadku nowotworów płuc, piersi, stercza i jajników odnotowano mutacje w somatycznym genie *Keap1*, które wywołują dysfunkcję Keap1 objawiającą się brakiem możliwości kompleksowania i hamowania aktywności Nrf2 [105]. Najczęstsze mutacje w genie *Keap1* (około 65%) dotyczą domeny DGR odpowiedzialnej za tworzenie kompleksu z Nrf2 [48,65,71]. Innym rodzajem mutacji pod względem częstości występowania (około 29%) są modyfikacje w domenie IVR prowadzące do dysfunkcji Keap1 jako inhibitora Nrf2 [87,105]. Przyczyną dysfunkcji białka Keap1 w komórkach nowotworowych są również epigenetyczne zmiany w DNA prowadzące do całkowitego wyłączenia ekspresji Keap1, co obserwowano w przypadku metylacji DNA komórek nowotworów płuc linii A549 i NCI-H460 [98] oraz komórek nowotworu stercza linii DU-145 i PC3 [105]. Natomiast w komórkach raka brodawkowego nerki stwierdzono, że z chwilą utraty aktywności hydratazy fumaranu, w cytoplazmie gromadzi się fumaran, który może reagować z cząsteczką Keap1 powodując suksynylację grup tiolowych reszt cysteinyliowych w cząsteczce Keap1 wywołujących zmiany konformacji cząsteczki i dysfunkcję Keap1 jako inhibitora Nrf2 [1].

Na powstawanie kompleksów Keap1-Nrf2 wpływają również mutacje genu *NFE2L2* głównie w obrębie kodującym domenę Neh2 obserwowane często (do 25% wszystkich przebadanych dotąd nowotworów) w genomie komórek nowotworowych. Mutacje te modyfikują jedynie sposób wiązania Nrf2 do Keap1 nie wpływając na funkcję Nrf2 jako czynnika transkrypcyjnego [83]. Gen *NFE2L2* może ulegać mutacji także w obrębie domeny Neh1 w regionie NES, którego zmiany zaburzają usuwanie aktywnego Nrf2 z jądra, a tym samym jego kumulację i nieograniczoną aktywność transkrypcyjną [29].

Niezależnie od zmienności komórki nowotworowe charakteryzują się tendencją do nadekspresji i kumulacji wielu rodzajów białek wchodzących w interakcję z Nrf2 lub Keap1. Przykładem takich białek są p21 i p62, których duże stężenie w komórkach nowotworowych zaburza interakcje w kompleksie Nrf2-Keap1 [26]. W nowotworach żołądka, płuc, piersi czy stercza odnotowano duże stężenie białka KAP1, co dodatkowo podwyższa aktywność transkrypcyjną Nrf2 [28]. Ponadto w wyniku podwyższonej aktywności onkogenów, takich jak: k-Ras, B-Raf, czy

c-Myc dochodzi do nadekspresji Nrf2, zwiększając nadmiernie biosyntezę enzymów antyoksydacyjnych (GST, NQO1), co zapewnia komórkom nowotworowym odporność na stres oksydacyjny wywołany terapią przeciwnowotworową [13,43]. Przedstawione sposoby niekontrolowanej aktywacji Nrf2 w komórkach nowotworowych najczęściej występują niezależnie od siebie, ale także nie wykluczają się wzajemnie (ryc. 6).

Podwyższona aktywność Nrf2 w komórkach nowotworowych stwarza poważne problemy podczas farmakoterapii, gdyż Nrf2 ochroni komórki nowotworowe przed powstawaniem stresu oksydacyjnego, wywołwanego nasiloną generacją RFT, wynikającą z metabolizmu stosowanych leków skuteczniej niż sąsiadujące komórki niezmodyfikowane [39]. Nowotwory charakteryzujące się znacząco podwyższoną aktywnością Nrf2, są odporne na farmakoterapię i charakteryzują się złymi rokowaniami [9]. Natomiast wyciszenie genu *NFE2L2* u myszy z nowotworem sutka zmniejsza inwazyjność nowotworu, a nawet hamuje jego rozwój [3]. Dlatego coraz częściej nowych leków o działaniu przeciwnowotworowym szuka się wśród substancji będących potencjalnymi inhibitorami Nrf2. Jednym z takich związków jest brusatol, który charakteryzuje się lepszą skutecznością w niszczeniu komórek nowotworu płuc linii A549 od powszechnie stosowanej cisplatyny [79]. Jednak ze względu na bardzo zbliżoną budowę wszystkich białek z motywem zamka leucynowego trudno znaleźć dobry inhibitor Nrf2, który będzie działał na tyle swoiście, aby można wykluczyć jego działania niepożądane. Aktywność transkrypcyjną Nrf2 próbowano także obniżyć przez modyfikację aktywności kinazy PI3K. Inhibicja aktywności tej kinazy i obniżenie stopnia fosforylacji cząsteczki Nrf2 obniżają tempo przemieszczania się do jądra komórkowego oraz aktywność tyranskrypcyjną tego czynnika [97].

Nową metodą leczenia nowotworów wykorzystującą modyfikację aktywności transkrypcyjnej Nrf2 jest terapia genowa z użyciem wirusowych wektorów przenoszących konstrukty genowe bogate w sekwencje ARE oraz geny kinazy tymidynowej (TK). Po zaszczepieniu komórkom nowotworowym konstruktów genowych, duża aktywność Nrf2 prowadzi do nadekspresji TK. Następnie pacjentom podaje się nietoksyczny lek gancyklowir (GCV), którego metabolit powstały w wyniku działania TK wykazuje ogromną cytotoksyczność. Skutki terapii stwierdza się jedynie w przypadku komórek z dużą aktywnością Nrf2 oraz komórek bezpośrednio sąsiadujących (efekt sąsiedztwa). Skuteczność terapii może być poprawiona przez jednoczesne stosowanie doksorubicyny [53].

Dokładne poznanie drogi sygnałowej Nrf2-ARE inaktywującej zarówno reaktywne metabolity egzogennych kancerogenów, jak i endogenne czynniki modyfikujące DNA pozwoliłoby w precyzyjny sposób regulować aktywność czynnika transkrypcyjnego Nrf2, który regulując ekspresję tak wielu genów związanych z kancerogenezą, umożliwiłby wielokierunkową ingerencję w ten proces.

CZNNIK TRANSKRYPCYJNY Nrf1

Istotnym w funkcjonowaniu komórki czynnikiem transkrypcyjnym z rodziny białek CNC jest Nrf 1 (nuclear respiratory factor 1). Jest kodowany przez gen *NFE2L1* [88]. Budowa cząsteczki Nrf1 jest bardzo podobna do Nrf2 (ryc. 1). W jego budowie wyróżnia się domenę Neh2 - wysoce homologiczną do domeny Neh2 w Nrf2, dzięki czemu w miejscu tym Nrf1 może się również przyłączać białko Keap1, jednak w przypadku Nrf1 tworzenie kompleksu z Keap1 nie ma wpływu na aktywność transkrypcyjną tego czynnika [99]. W budowie Nrf1 wyróżnia się wysoce konserwatywną domenę kotwiczącą, dzięki której może się przyłączać do siateczki śródplazmatycznej, a w cytoplazmie pozostawać w postaci nieaktywnej [106]. N-terminalny fragment tego białka jest bogaty w takie aminokwasy jak asparagina, seryna oraz treonina, które mogą ulegać glikozylacji i wpływać na tempo translokacji czynnika do jądra [107]. W warunkach stresu oksydacyjnego Nrf1 jest odłączany od siateczki śródplazmatycznej i ulega translokacji do jądra komórkowego [106]. Aby doszło do aktywacji Nrf1 niezbędne jest stworzenie kompleksu z innym białkiem z domeną zamka leucynowego (najczęściej jest to małe białko Maf) [33]. Mimo obecności domeny bZIP zarówno w Nrf1 jak i w Nrf2, białka te nigdy ze sobą nie heterodimeryzują [96]. Jednak w warunkach stresu oksydacyjnego Nrf1 może tworzyć dimery w jądrze komórkowym nie tylko z Maf, ale także z białkiem z rodziny Jun (c-Jun, Jun-B lub Jun-D) [55,62]. Następnie tak powstały heterodimer przyłącza się do DNA w sekwencji ARE i podobnie jak Nrf2 aktywuje transkrypcję genów [94]. Wykazano, że podwyższenie stężenia białek z rodziny Jun w cytoplazmie komórki w dużym stopniu wpływa na podwyższenie aktywności zarówno Nrf1 jak i Nrf2. Jest to związane z heterodimeryzacją niezbędną do aktywacji tych czynników transkrypcyjnych, jednak mechanizm powstawania takich kompleksów nie jest znany. Zakłada się, że w procesie dimeryzacji dodatkowo bierze udział niepoznany dotąd czynnik – być może o charakterze enzymu fosforylującego [16].

Dotychczasowe badania wskazują, że czynnik Nrf1 podobnie jak Nrf2 wpływa na biosyntezę proprzeżyciowych białek w celu ochrony ich przed stresem, jednak w przypadku Nrf1 jako główne produkty ekspresji zidentyfikowano metalotioneiny (MT1 i MT2) [72]. Wykazano, że aktywny Nrf1 może wpływać nie tylko na ekspresję enzymów antyoksydacyjnych (enzymów II fazy lub metalotionein), ale także innych czynników wpływających na funkcjonowanie komórki w warunkach stresu oksydacyjnego. Badania komórek wątroby szczura wskazują, że czynnik transkrypcyjny Nrf1 reguluje ekspresję białka AP-1 oraz białek z rodziny NF- κ B [101]. Ponadto przez aktywowanie ekspresji genów globin Nrf1 ma wpływ na biosyntezę hemu [82].

Wyniki eksperymentów przeprowadzonych na embrionach myszy z wyciszonymi genami *NFE2L1* wskazują na ogromne znaczenie tych czynników w rozwoju i funkcjonowaniu organizmu. Zarodki pozbawione Nrf1 obumie-

raja we wczesnych stadiach rozwojowych. Za przyczynę śmierci embrionów uważa się anemię [21]. Jednoczesne pozbawienie embrionów zarówno Nrf1, jak i Nrf2 powoduje szybką śmierć wynikającą z działania białka p53 aktywowanego przez RFT. Brak ekspresji białek Nrf1 i Nrf2 obniża odporność komórek na stres oksydacyjny, natomiast śmierci embrionów można zapobiec podając zwiększonym antyoksydanty [54].

Za dysfunkcję Nrf1 mogą odpowiadać liczne mutacje. Jedną z najczęstszych przyczyn zaburzenia funkcji transkrypcyjnej Nrf1 są mutacje reszty leucyny w prolinę w obrębie domeny zamka leucynowego bZIP. Reszta kwasowa tego aminokwasu odpowiada za poprawne tworzenie kompleksów preinicjacyjnych oraz wiązanie cząsteczki DNA, dlatego im więcej jest tych zmodyfikowanych aminokwasów, tym mniejsza jest zdolność do tworzenia kompleksów oraz przyłączania DNA, a co się z tym wiąże – mniejsza jest aktywność Nrf1 jako czynnika transkrypcyjnego [94].

CZNNIKI TRANSKRYPCYJNE Nrf3 i p45NF-E2

Czynniki transkrypcyjne Nrf3 i p45NF-E2 należą do najsłabiej poznanych białek z rodziny CNC. W budowie Nrf3 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3) jak dotąd zidentyfikowano jedynie domenę Neh3 i Neh6 (ryc. 1), a jego masę cząsteczkową określono na 73 kDa [46]. Ponadto stwierdzono, że w wyniku powstania w komórce stresu oksydacyjnego Nrf3 przemieszcza się z cytoplazmy do jądra komórkowego i tak jak inne białka CNC może tworzyć dimery z małym białkiem Maf, a następnie jako aktywny kompleks przyłącza się do genomowego DNA w sekwencji ARE, co rozpoczyna transkrypcję genów [46]. Największą ekspresję Nrf3 odnotowano w limfocytach B oraz monocytach we krwi łożyskowej człowieka [74]. Inne badania wskazują, że przyłączenie β -globiny do kompleksu Nrf3-Maf powoduje wzmocnienie wiązania do DNA oraz nasila transkrypcję genów białek antyoksydacyjnych [76]. Ponadto stwierdzono, że myszy z wyciszonym genem *Nrf3* poddane działaniu czynników stresogennych np. benzopirenu z dymu papierosowego charakteryzują się wyższą śmiertelnością niż zwierzęta kontrolne, natomiast zwierzęta o obniżonej aktywności transkrypcyjnej białka Nrf3 były bardziej podatne na kancerogenezę oraz śmierć w wyniku rozwoju chłoniaków [11].

Czynnik transkrypcyjny p45NF-E2 (nuclear factor (erythroid-derived 2) protein 45) ulega ekspresji w największym stopniu w leukocytach krwi [5]. Podobnie jak pozostałe czynniki z rodziny białek CNC p45NF-E2 może się przemieszczać do jądra komórkowego, a następnie może tworzyć dimery z innym białkiem mającym domenę zamka leucynowego (najczęściej jest to małe białko z rodziny Maf) [73]. Tak uformowany kompleks jest zdolny do przyłączenia się do DNA i rozpoczęcia transkrypcji genów [2]. Dokładny mechanizm działania p45NF-E2 oraz geny, które ulegają pod jego wpływem ekspresji nie są jeszcze zbadane. Jednak dotychczasowe badania wskazują, że czynnik ten również bierze udział w reakcji obronnej komórek krwi przeciwko RFT [5]. p45NF-E2 jest białkiem, które-

go ekspresję odnotowano w komórkach wyizolowanych z trofoblastu myszy, natomiast niedobór tego czynnika powoduje zaburzenia podczas tworzenia łożyska we wczesnym stadium rozwoju embrionów tych zwierząt [36].

PODSUMOWANIE

W warunkach fizjologicznych białka Nrf występują w cytoplazmie w postaci nieaktywnej. Sytuacja zmienia się w warunkach stresowych, kiedy cząsteczki te ulegają ak-

tywacji i translokacji do jądra komórkowego, gdzie rozpoczynają transkrypcję białek cytoprotekcyjnych, stabilizujących zdolności antyoksydacyjne komórki i chroniących ją przed negatywnym działaniem ksenobiotyków oraz RFT. Zatem czynniki transkrypcyjne Nrf, będąc odpowiedzialne za indukcję zarówno enzymatycznych jak i drobnocząsteczkowych białkowych antyoksydantów, mogą być rozpatrywane jako potencjalny cel oddziaływania czynników chemoprewencyjnych w profilaktyce chorób nowotworowych.

PIŚMIENICTWO

- [1] Adam J., Hatipoglu E., O'Flaherty L., Ternette N., Sahgal N., Lockstone H., Baban D., Nye E., Stamp G.W., Wolhuter K., Stevens M., Fischer R., Carmeliet P., Maxwell P.H., Pugh C.W. et. al: Renal cyst formation in Fh1-deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway: roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer Cell*, 2011; 20: 524-537
- [2] Amrolia P.J., Ramamurthy L., Saluja D., Tanese N., Jane S.M., Cunningham J.M.: The activation domain of the enhancer binding protein p45NF-E2 interacts with TAF_{II}130 and mediates long-range activation of the α - and β -globin gene loci in an erythroid cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 10051-10056
- [3] Becks L., Prince M., Burson H., Christophe C., Broadway M., Itoh K., Yamamoto M., Mathis M., Orchard E., Shi R., McLarty J., Pruitt K., Zhang S., Kleiner-Hancock H.E.: Aggressive mammary carcinoma progression in Nrf2 knockout mice treated with 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene. *BMC Cancer*, 2010; 10: 1-17
- [4] Chan J.Y., Han X.L., Kan Y.W.: Cloning of Nrf1, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 11371-11375
- [5] Chan J.Y., Kwong M., Lo M., Emerson R., Kuypers F.A.: Reduced oxidative-stress response in red blood cells from p45NFE2-deficient mice. *Blood*, 2001; 97: 2151-2158
- [6] Chang J., Ma J.Z., Zeng Q., Cechova S., Gantz A., Nievergelt C., O'Connor D., Lipkowitz M., Le T.H.: Loss of *GSTM1*, a *NRF2* target, is associated with accelerated progression of hypertensive kidney disease in the African American Study of Kidney Disease (AASK). *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2013; 304: F348-F355
- [7] Chen H., Li J., Li H., Hu Y., Tevebaugh W., Yamamoto M., Que J., Chen X.: Transcript profiling identifies dynamic gene expression patterns and an important role for Nrf2/Keap1 pathway in the developing mouse esophagus. *PLoS One*, 2012; 7: e36504
- [8] Chen W., Sun Z., Wang X.J., Jiang T., Huang Z., Fang D., Zhang D.D.: Direct interaction between Nrf2 and p21^{Cip1/WAF1} upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol. Cell*, 2009; 34: 663-673
- [9] Chen X.L., Kunsch C.: Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Curr. Pharm. Des.*, 2004; 10: 879-891
- [10] Cheng X., Chapple S.J., Patel B., Puszyk W., Sugden D., Yin X., Mayr M., Siow R.C., Mann G.E.: Gestational diabetes impairs Nrf2-mediated adaptive antioxidant defenses and redox signaling in fetal endothelial cells in utero. *Diabetes*, 2013; 62: 4088-4097
- [11] Chevillard G., Paquet M., Blank V.: Nfe2l3 (Nrf3) deficiency predisposes mice to T-cell lymphoblastic lymphoma. *Blood*, 2011; 117: 2005-2008
- [12] 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
- [13] 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., Iacobuzio-Donahue C., Kern S.E. i wsp.: Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*, 2011; 475: 106-109
- [14] 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
- [15] Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Cole R.N., Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Yamamoto M., Talalay P.: Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 11908-11913
- [16] Han W., Ming M., Zhao R., Pi J., Wu C., He Y.Y.: Nrf1 CNC-bZIP protein promotes cell survival and nucleotide excision repair through maintaining glutathione homeostasis. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 18788-18795
- [17] Hanada N., Takahata T., Zhou Q., Ye X., Sun R., Itoh J., Ishiguro A., Kijima H., Mimura J., Itoh K., Fukuda S., Saijo Y.: Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2012; 12: 1-11
- [18] Hashimoto H., Vertino P.M., Cheng X.: Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics*, 2010; 2: 657-669
- [19] Herzog M., Wendling O., Guillou F., Chambon P., Mark M., Losson R., Cammas F.: TIF1 β association with HP1 is essential for post-gastrulation development, but not for Sertoli cell functions during spermatogenesis. *Dev. Biol.*, 2011; 350: 548-558
- [20] Hintze K.J., Wald K.A., Zeng H., Jeffery E.H., Finley J.W.: Thioredoxin reductase in human hepatoma cells is transcriptionally regulated by sulforaphane and other electrophiles via an antioxidant response element. *J. Nutr.*, 2003; 133: 2721-2727
- [21] Hirotsu Y., Hataya N., Katsuoka F., Yamamoto M.: NF-E2-related factor 1 (Nrf1) serves as a novel regulator of hepatic lipid metabolism through regulation of the *Lipin1* and *PGC-1 β* genes. *Molec. Cell. Biol.*, 2012; 32: 2760-2770
- [22] Hong F., Sekhar K.R., Freeman M.L., Liebler D.C.: Specific patterns of electrophile adduction trigger Keap1 ubiquitination and Nrf2 activation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 31768-31775
- [23] Hosoya T., Clifford M., Losson R., Tanabe O., Engel J.D.: TRIM28 is essential for erythroblast differentiation in the mouse. *Blood*, 2013; 122: 3798-3807
- [24] 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
- [25] Hubbs A.F., Benkovic S.A., Miller D.B., O'Callaghan J.P., Battelli L., Schwegler-Berry D., Ma Q.: Vacuolar leukoencephalopathy with

widespread astrogliosis in mice lacking transcription factor Nrf2. *Am. J. Pathol.*, 2007; 170: 2068-2076

[26] Inoue D., Suzuki T., Mitsuishi Y., Miki Y., Suzuki S., Sugawara, S., Watanabe M., Sakurada A., Endo C., Uruno A., Sasano H., Nakagawa T., Satoh K., Tanaka N., Kubo H. i wsp.: Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.*, 2012; 103: 760-766

[27] 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

[28] Iyengar S., Farnham P.J.: KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 26267-26276

[29] 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

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

[31] Jain A.K., Lamark T., Sjøttem E., Larsen K.B., Awuh J.A., Øvervatn A., McMahon M., Hayes J.D., Johansen T.: p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 22576-22591

[32] Jayapaul J., Jaiswal A.K.: Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE)-mediated expression and induction of γ -glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem. Pharmacol.*, 2000; 59: 1433-1439

[33] Johnsen Ø., Murphy P., Prydz H., Kolstø A.B.: Interaction of the CNC-bZIP factor TCF11/LCR-F1/Nrf1 with MafG: binding-site selection and regulation of transcription. *Nucleic Acids Res.*, 1998; 26: 512-520

[34] Kansanen E., Jyrkkänen H.K., Levenon A.L.: Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012; 52: 973-982

[35] Kanzaki H., Shinohara F., Kajiya M., Kodama T.: The Keap1/Nrf2 protein axis plays a role in osteoclast differentiation by regulating intracellular reactive oxygen species signaling. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 23009-23020

[36] Kashif M., Hellwig A., Kolleker A., Shahzad K., Wang H., Lang S., Wolter J., Thati M., Vinnikov I., Bierhaus A., Nawroth P.P., Isermann, B.: p45NF-E2 represses Gcm1 in trophoblast cells to regulate syncytium formation, placental vascularization and embryonic growth. *Development*, 2011; 138: 2235-2247

[37] Kaspar J.W., Jaiswal A.K.: Antioxidant-induced phosphorylation of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of Bach1 that allows Nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 153-162

[38] Kawai Y., Garduño L., Theodore M., Yang J., Arinze I.J.: Acetylation-deacetylation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) regulates its transcriptional activity and nucleocytoplasmic localization. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 7629-7640

[39] Kensler T.W., Wakabayashi N., Biswal S.: Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2007; 47: 89-116

[40] Kim J.E., You D.J., Lee C., Ahn C., Seong J.Y., Hwang J.I.: Suppression of NF- κ B signaling by KEAP1 regulation of IKK β activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation. *Cell. Signal.*, 2010; 22: 1645-1654

[41] Kim J.H., Xu E.Y., Sacks D.B., Lee J., Shu L., Xia B., Kong A.N.: Identification and functional studies of a new Nrf2 partner IQGAP1: a critical role in the stability and transactivation of Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.*, 2013; 19: 89-101

[42] Kim K.C., Kang K.A., Zhang R., Piao M.J., Kim G.Y., Kang M.Y., Lee S.J., Lee N.H., Surh Y.J., Hyun J.W.: Up-regulation of Nrf2-mediated

heme oxygenase-1 expression by eckol, a phlorotannin compound, through activation of Erk and PI3K/Akt. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2010; 42: 297-305

[43] 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

[44] Kimura M., Yamamoto T., Zhang J., Itoh K., Kyo M., Kamiya T., Aburatani H., Katsuoka F., Kurokawa H., Tanaka T., Motohashi H., Yamamoto M.: Molecular basis distinguishing the DNA binding profile of Nrf2-Maf heterodimer from that of Maf homodimer. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 33681-33690

[45] Klaunig J.E., Kamendulis L.M., Hocevar B.A.: Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.*, 2010; 38: 96-109

[46] Kobayashi A., Ito E., Toki T., Kogame K., Takahashi S., Igarashi K., Hayashi N., Yamamoto M.: Molecular cloning and functional characterization of a new Cap'n' collar family transcription factor Nrf3. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 6443-6452

[47] Kobayashi M., Itoh K., Suzuki T., Osanai H., Nishikawa K., Katoh Y., Takagi Y., Yamamoto M.: Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells.*, 2002; 7: 807-820

[48] Konstantinopoulos P.A., Spentzos D., Fountzilias E., Francoeur N., Sanisetty S., Grammatikos A.P., Hecht J.L., Cannistra S.A.: Keap1 mutations and Nrf2 pathway activation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.*, 2011; 71: 5081-5089

[49] Landschulz W.H., Johnson P.F., McKnight S.L.: The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 1988; 240: 1759-1764

[50] Lau A., Wang X.J., Zhao F., Villeneuve N.F., Wu T., Jiang T., Sun Z., White E., Zhang D.D.: A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol. Cell. Biol.*, 2010; 30: 3275-3285

[51] Lau W.K., Chan S.C., Law A.C., Ip M.S., Mak J.C.: The role of MAPK and Nrf2 pathways in ketanserine-elicited attenuation of cigarette smoke-induced IL-8 production in human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Sci.*, 2012; 125: 569-577

[52] Lee S., Hur E.G., Ryoo I.G., Jung K.A., Kwak J., Kwak M.K.: Involvement of the Nrf2-proteasome pathway in the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic β -cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2012; 264: 431-438

[53] Leinonen H.M., Ruotsalainen A.K., Määttä A.M., Laitinen H.M., Kuosmanen S.M., Kansanen E., Pikkarainen J.T., Lappalainen J.P., Samaranayake H., Lesch H.P., Kaikkonen M.U., Ylä-Herttuala S., Levenon A.L.: Oxidative stress-regulated lentiviral TK/GCV gene therapy for lung cancer treatment. *Cancer Res.*, 2012; 72: 6227-6235

[54] Leung L., Kwong M., Hou S., Lee C., Chan J.Y.: Deficiency of the Nrf1 and Nrf2 transcription factors results in early embryonic lethality and severe oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 48021-48029

[55] Levy S., Jaiswal A.K., Forman H.J.: The role of c-Jun phosphorylation in EpRE activation of phase II genes. *Free Radic. Biol. Med.*, 2009; 47: 1172-1179

[56] Lewerenz J., Albrecht P., Tien M.L.T., Henke N., Karumbayaram S., Kornblum H.I., Wiedau-Pazos M., Schubert D., Maher P., Methner A.: Induction of Nrf2 and xCT are involved in the action of the neuroprotective antibiotic ceftriaxone in vitro. *J. Neurochem.*, 2009; 111: 332-343

[57] Li W., Khor T.O., Xu C., Shen G., Jeong W.S., Yu S., Kong A.N.: Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF κ B-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem. Pharmacol.*, 2008; 76: 1485-1489

[58] 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

- [59] Martin D., Rojo A.I., Salinas M., Diaz R., Gallardo G., Alam J., De Galarreta C.M., Cuadrado A.: Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 8919-8929
- [60] Martín-Montalvo A., Villalba J.M., Navas P., De Cabo R.: NRF2, cancer and calorie restriction. *Oncogene*, 2011; 30: 505-520
- [61] 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
- [62] Meixner A., Karreth F., Kenner L., Penninger J.M., Wagner E.F.: Jun and JunD-dependent functions in cell proliferation and stress response. *Cell Death Differ.*, 2010; 17: 1409-1419
- [63] 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
- [64] Muscarella L.A., Barbano R., D'Angelo V., Copetti M., Coco M., Balsamo T., La Torre A., Notarangelo A., Troiano M., Parisi S., Icolaro N., Catapano D., Valori V.M., Pellegrini F., Merla G. i wsp.: Regulation of *KEAP1* expression by promoter methylation in malignant gliomas and association with patient's outcome. *Epigenetics*, 2011; 6: 317-325
- [65] Nioi P., Nguyen T.: A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 362: 816-821
- [66] Niture S.K., Jain A.K., Jaiswal A.K.: Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC- δ -mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J. Cell. Sci.*, 2009; 122: 4452-4464
- [67] Niture S.K., Jain A.K., Shelton P.M., Jaiswal A.K.: Src subfamily kinases regulate nuclear export and degradation of transcription factor Nrf2 to switch off Nrf2-mediated antioxidant activation of cytoprotective gene expression. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 28821-28832
- [68] 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
- [69] Niture S.K., Jaiswal A.K.: Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 9873-9886
- [70] Ohira M., Seki N., Nagase T., Ishikawa K., Nomura N., Ohara O.: Characterization of a human homolog (*BACH1*) of the mouse *Bach1* gene encoding a BTB-basic leucine zipper transcription factor and its mapping to chromosome 21q22. *1. Genomics*, 1998; 47: 300-306
- [71] Ohta T., Iijima K., Miyamoto M., Nakahara I., Tanaka H., Ohtsuji M., Suzuki T., Kobayashi A., Yokota J., Sakiyama T., Shibata T., Yamamoto M., Hirohashi, S.: Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res.*, 2008; 68: 1303-1309
- [72] Ohtsuji M., Katsuoka F., Kobayashi A., Aburatani H., Hayes J.D., Yamamoto M.: Nrf1 and Nrf2 play distinct roles in activation of antioxidant response element-dependent genes. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 33554-33562
- [73] Ono Y., Wang Y., Suzuki H., Okamoto S., Ikeda Y., Murata M., Poncz M., Matsubara Y.: Induction of functional platelets from mouse and human fibroblasts by *p45NF-E2/Maf*. *Blood*, 2012; 120: 3812-3821
- [74] Palma M., Lopez L., García M., de Roja N., Ruiz T., García J., Rosell E., Vela C., Rueda P., Rodriguez M.J.: Detection of collagen triple helix repeat containing-1 and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3 in colorectal cancer. *BMC Clin. Pathol.*, 2012; 12: 1-12
- [75] Paonessa J.D., Ding Y., Randall K.L., Munday R., Argoti D., Vouros P., Zhang Y.: Identification of an unintended consequence of Nrf2-directed cytoprotection against a key tobacco carcinogen plus a counteracting chemopreventive intervention. *Cancer Res.*, 2011; 71: 3904-3911
- [76] Pepe A.E., Xiao Q., Zampetaki A., Zhang Z., Kobayashi A., Hu Y., Xu Q.: Crucial role of Nrf3 in smooth muscle cell differentiation from stem cells. *Circ. Res.*, 2010; 106: 870-879
- [77] Pietsch E.C., Chan J.Y., Torti F.M., Torti S.V.: Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 2361-2369
- [78] Rada P., Rojo A.I., Evrard-Todeschi N., Innamorato N.G., Cotte A., Jaworski T., Tobón-Velasco J.C., Devijver H., García-Mayoral M.F., Van Leuven F., Hayes J.D., Bertho G., Cuadrado A.: Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by the glycogen synthase kinase 3/ β -TrCP axis. *Mol. Cell. Biol.*, 2012; 32: 3486-3499
- [79] Ren D., Villeneuve N.F., Jiang T., Wu T., Lau A., Toppin H.A., Zhang D.D.: Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 1433-1438
- [80] Requena J.R., Fu M.X., Ahmed M.U., Jenkins A.J., Lyons T.J., Thorpe S.R.: Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1996; 11, Suppl. 5: 48-53
- [81] Ryan R.F., Schultz D.C., Ayyanathan K., Singh P.B., Friedman J.R., Fredericks W.J., Rauscher F.J.III: KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Krüppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 4366-4378
- [82] Shao D., Liu Y., Liu X., Zhu L., Cui Y., Cui A., Qiao A., Kong X., Liu Y., Chen Q., Gupta N., Fang F., Chang Y.: PGC-1 β -Regulated mitochondrial biogenesis and function in myotubes is mediated by NRF-1 and ERR α . *Mitochondrion*, 2010; 10: 516-527
- [83] Shibata T., Ohta T., Tong K.I., Kokubu A., Odogawa R., Tsuta K., Asamura H., Yamamoto M., Hirohashi S.: Cancer related mutations in *NRF2* impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 13568-13573
- [84] 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
- [85] Suzuki H., Tashiro S., Sun J., Doi H., Satomi S., Igarashi K.: Cadmium induces nuclear export of Bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 49246-49253
- [86] Suzuki M., Betsuyaku T., Ito Y., Nagai K., Nasuhara Y., Kaga K., Kondo S., Nishimura M.: Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2008; 39: 673-682
- [87] 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
- [88] Tiranti V., Rossi E., Rocchi M., DiDonato S., Zuffardi O., Zeviani M.: The gene (NFE2L1) for human NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, maps to 7q32. *Genomics*, 1995; 27: 555-557
- [89] Tong K.I., 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
- [90] Um H.C., Jang J.H., Kim D.H., Lee C., Surh Y.J.: Nitric oxide activates Nrf2 through S-nitrosylation of Keap1 in PC12 cells. *Nitric Oxide*, 2011; 25: 161-168
- [91] Ungvari Z., Bailey-Downs L., Gautam T., Sosnowska D., Wang M., Monticone R.E., Telljohann R., Pinto J.T., de Cabo R., Sonntag W.E.,

- Lakatta E.G., Csiszar A.: Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate *Macaca mulatta*. *J. Gerontol. A*, 2011; 66: 866-875
- [92] Velichkova M., Hasson T.: Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism. *Mol. Cell. Biol.*, 2005; 25: 4501-4513
- [93] Venugopal R., Jaiswal A.K.: Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 14960-14965
- [94] Venugopal R., Jaiswal A.K.: Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene*, 1998; 17: 3145-3156
- [95] Vieira S.A., Deininger M.W., Sorour A., Sinclair P., Foron, L., Goldman J.M., Melo J.V.: Transcription factor BACH2 is transcriptionally regulated by the BCR/ABL oncogene. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001; 32: 353-363
- [96] Wakabayashi N., Shin S., Slocum S.L., Agoston E.S., Wakabayashi J., Kwak M.K., Misra V., Biswal S., Yamamoto M., Kensler T.W.: Regulation of notch1 signaling by nrf2: implications for tissue regeneration. *Sci. Signal.*, 2010; 3: 1-22
- [97] Wang L., Chen Y., Sternberg P., Cai J.: Essential roles of the PI3 kinase/Akt pathway in regulating Nrf2-dependent antioxidant functions in the RPE. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008; 49: 1671-1678
- [98] 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
- [99] Wang W., Chan J.Y.: Nrf1 is targeted to the endoplasmic reticulum membrane by an N-terminal transmembrane domain Inhibition of nuclear translocation and transacting function. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 19676-19687
- [100] Wang X.J., Sun Z., Chen W., Li Y., Villeneuve N.F., Zhang D.D.: Activation of Nrf2 by arsenite and monomethylarsonous acid is independent of Keap1-C151: enhanced Keap1-Cul3 interaction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2008; 230: 383-389
- [101] Yang H., Magilnick N., Lee C., Kalmaz D., Ou X., Chan J.Y., Lu S.C.: Nrf1 and Nrf2 regulate rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit transcription indirectly via NF- κ B and AP-1. *Mol. Cell. Biol.*, 2005; 25: 5933-5946
- [102] Yu R., Chen C., Mo Y.Y., Hebbar V., Owuor E.D., Tan T.H., Kong A.N.: Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 39907-39913
- [103] Yu S., Khor T.O., Cheung K.L., Li W., Wu T. Y., Huang Y., Foster B.A., Kan Y.W., Kong, A.N.: Nrf2 expression is regulated by epigenetic mechanisms in prostate cancer of TRAMP mice. *PLoS One*, 2010; 5: e8579
- [104] Yu X., Kensler T.: Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. *Mutat. Res./Fundam. Molec. Mech. Mutagen.*, 2005; 591: 93-102
- [105] Zhang P., Singh A., Yegnasubramanian S., Esopi D., Kombairaju P., Bodas M., Wu H., Bova S.G., Biswal S.: Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth. *Mol. Cancer Ther.*, 2010; 9: 336-346
- [106] Zhang Y., Crouch D.H., Yamamoto M., Hayes J.D.: Negative regulation of the Nrf1 transcription factor by its N-terminal domain is independent of Keap1: Nrf1, but not Nrf2, is targeted to the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.*, 2006; 399: 373-385
- [107] Zhang Y., Lucocq J.M., Yamamoto M., Hayes J.D.: The NHB1 (N-terminal homology box 1) sequence in transcription factor Nrf1 is required to anchor it to the endoplasmic reticulum and also to enable its asparagine-glycosylation. *Biochem. J.*, 2007; 408: 161-172
- [108] Zhang Y., Sano M., Shinmura K., Tamaki K., Katsumata Y., Matsushashi T., Morizane S., Ito H., Hishiki T., Endo J., Zhou H., Yuasa S., Kaneda R., Suematsu M., Fukuda K.: 4-Hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2010; 49: 576-586
- [109] Zhu H., Jia Z., Zhang L., Yamamoto M., Misra H.P., Trush M.A., Li Y.: Antioxidants and phase 2 enzymes in macrophages: regulation by Nrf2 signaling and protection against oxidative and electrophilic stress. *Exp. Biol. Med.*, 2008; 233: 463-474

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.