



Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

DZIEDZINA NAUKI MEDYCZNE

DYSCYPLINA NAUKI MEDYCZNE

ROZPRAWA DOKTORSKA

Ocena statusu mutacyjnego genów układu *NRF2-KEAP1* u chorych na operacyjnego niedrobnokomórkowego raka płuca z regionu północno-wschodniej Polski.

MICHALINA KRYSZCZUK

Promotor: prof. dr hab. Jacek Nikliński

Promotor pomocniczy: dr Oksana Kowalczuk

Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej

Kierownik jednostki prof. dr hab. Jacek Nikliński

Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej UMB

Białystok, 2023



Medical University of Białystok

FIELD OF SCIENCE MEDICAL SCIENCES

SCIENTIFIC DISCIPLINE MEDICAL SCIENCES

DOCTORAL THESIS

Assessment of the mutational status of the NRF2-KEAP1 system genes in patients with operable non-small cell lung cancer from the north-eastern region of Poland.

MICHALINA KRYSZCZUK

First supervisor: prof. dr hab. Jacek Nikliński

Assisting supervisor: dr Oksana Kowalczuk

Department of Clinical Molecular Biology

Head of department prof. dr hab. Jacek Nikliński

The doctoral thesis was carried out as a part of education at the Doctoral School of MUB

Białystok, 2023

Chciałabym bardzo podziękować doktor Oksanie Kowalczyk za nieocenione wsparcie podczas powstawiania tej pracy. Bez jej wyrozumiałości, życzliwości i cennych rad napisanie niemniejszej pracy byłoby niemożliwe.

Chciałabym również podziękować profesorowi Jackowi Niklińskiemu, który zawsze służył radą oraz pomocą.

Spis treści

I. WSTĘP	5
1.1 Ogólna charakterystyka niedrobnokomórkowego raka płuca.	5
1.2 Podłoże genetyczne rozwoju raka płuca.....	6
1.3 Białko NRF2.....	8
1.3.1 Krótka charakterystyka NRF2	8
1.3.2 Ujęcie stresu oksydacyjnego w organizmie.	8
1.3.3 Budowa NRF2.	9
1.3.4 Mechanizmy regulacji aktywności NRF2.....	10
1.3.5 Regulacja aktywności NRF2 za pomocą KEAP1.	10
1.3.6 Regulacja aktywności NRF2 na poziomie transkrypcji.	12
1.3.7 Regulacja aktywności NRF2 na poziomie translacji.	12
1.3.8 Potranslacyjna regulacja aktywności NRF2.....	12
1.3.9 Epigenetyczna regulacja aktywności NRF2.	14
1.3.10 Wpływ innych białek na aktywność NRF2.....	16
1.3.11 Powiązanie innych komórkowych ścieżek sygnałowych ze szlakiem NRF2- KEAP1.	16
1.4 Rola biologiczna czynnika transkrypcyjnego NRF2.....	17
1.4.1 Rola NRF2 w warunkach fizjologicznych.	18
1.4.2 Rola NRF2 w warunkach patologicznych.....	20
1.4.3 Działanie NRF2 w czasie chemioterapii.....	22
II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY	24
III. MATERIAŁY I METODY	25
3.1 Izolacja DNA.....	26
3.2 Namnożenie eksonu 2 <i>NFE2L2</i> oraz 6 eksonów <i>KEAP1</i>	28
3.3 Wykrywanie uzyskanych produktów PCR oraz ich oczyszczanie.....	30
3.4 Reakcja sekwencjonowania.....	31
3.5 Oczyszczanie produktów reakcji sekwencyjnego PCR.....	32
3.6 Sekwencjonowanie.....	33
IV. WYNIKI	35
V. DYSKUSJA	42
VI. WNIOSKI	45
VII. STRESZCZENIE	46

VIII.	ABSTRAKT.....	47
IX.	PIŚMIENNICTWO.....	48
X.	WYKAZ TABEL.....	64
XI.	WYKAZ RYCIN.....	65

I. WSTĘP

1.1 Ogólna charakterystyka niedrobnokomórkowego raka płuca.

W dzisiejszych czasach nowotwory stanowią jedną ze szczególnie często wykrywanych chorób. Jest to częściowo spowodowane wzrostem długości życia ludzi i w dużej mierze związane z postępowaniem medycyny i możliwościami, które medycyna daje w leczeniu różnych chorób. Jako przykład, w Polsce średnia długość życia wzrosła z około 36 lat w roku 1800 do niemal 80 lat w 2018 (1). Jednocześnie szacuję się, że w Polsce, co roku, choroba nowotworowa jest diagnozowana u około 85 tysięcy ludzi i stanowi drugą co do kolejności przyczynę zgonów wśród ludności (zaraz po chorobach układu krążenia) (2). Niepokojącym jest fakt, że wśród kobiet w grupie wiekowej 45-64 lata, nowotwory odpowiadają za niemal 50% zgonów, co przewyższa dwukrotnie odsetek zgonów spowodowany przez choroby układu krążenia. Wśród mężczyzn, w tej samej grupie wiekowej, nowotwory odpowiadają za około 33% zgonów (2). Liczby te przekładają się na zatrważający wynik 100 tysięcy zgonów rocznie spowodowanych chorobami nowotworowymi (2). Na świecie według danych z Global Cancer Observatory, co roku nowotwory są wykrywane u 19 milionów osób, a śmierć z ich powodu dotyka 10 milionów pacjentów (3).

Najczęstszą przyczyną zgonów wśród mężczyzn i drugą co do częstości wśród kobiet stanowią złośliwe nowotwory płuc, będące przyczyną niemal 2 milionów zgonów rocznie (3). Jest to jeden z najgorzej rokujących nowotworów. Głównym czynnikiem predysponującym do rozwoju nowotworu płuc jest palenie tytoniu. Ponad 80% pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem płuc, było lub często nadal są nałogowymi palaczami tytoniu (4; 5). Ponadto kombinacja palenia tytoniu z narażeniem na azbest zwiększa ryzyko 40-to krotnie w porównaniu do samego palenia tytoniu (5). Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (np. benzopiren), który znajduje się w dymie papierosowym, w organizmie przekształca się w epoksyd diolu benzopirenu (4). Jest to związek bardzo mutagenny, a co za tym idzie bardzo szkodliwy dla ludzkiego organizmu przy dłuższym narażeniu (4; 6). Osoby będące biernymi palaczami bądź żyjące w zanieczyszczonym środowisku (skażenie wód gruntowych chemikaliami lub bardzo zanieczyszczone powietrze, smog) również mają zwiększone ryzyko zachorowania na nowotwór płuca (5; 6). Zostało ustalone, że ryzyko rozwoju choroby zwiększają również obciążenia rodzinne (7).

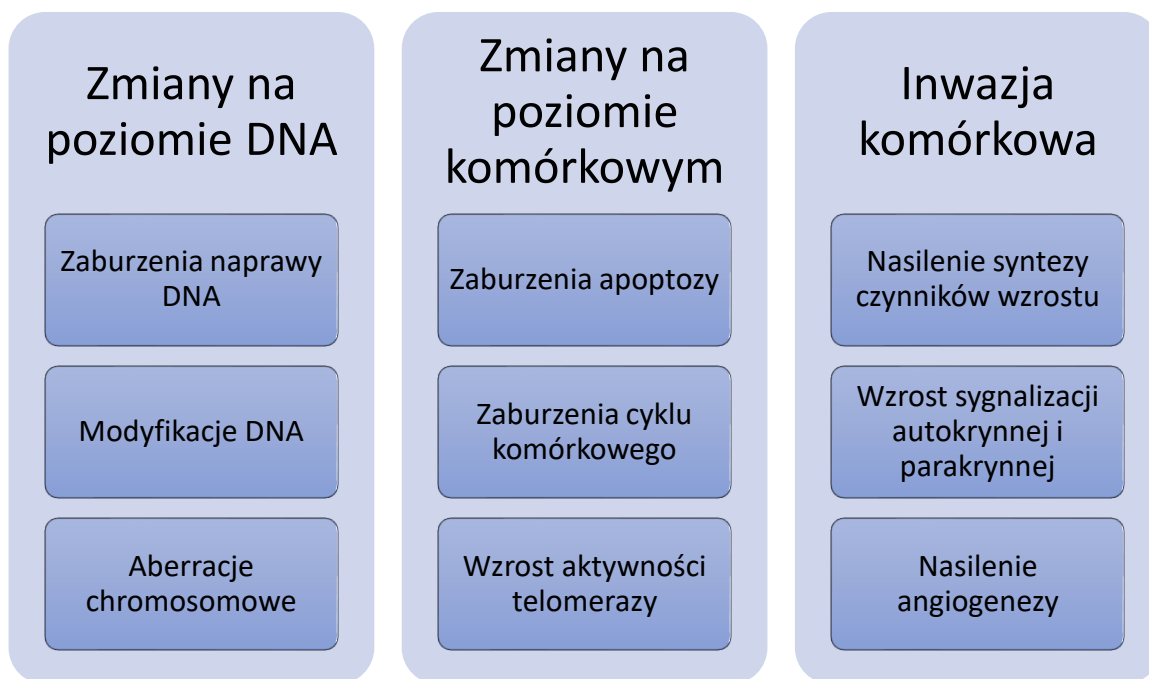
Histologicznie wyróżniają się następujące rodzaje raka płuca: guzki płucne, międzybłoniak, drobnokomórkowy rak płuca (SCLC) oraz rak niedrobnokomórkowy (NSCLC) (8). Guzki płucne oraz międzybłoniak są rzadko spotykane, rak drobnokomórkowy stanowi ok. 1/6 diagnozowanych przypadków raka płuca, natomiast rak niedrobnokomórkowy niemal 5/6 (8). Patomorfologicznie wśród NSCLC wyróżnia się rak płaskonabłonkowy (40% przypadków) oraz niepłaskonabłonkowy (60% przypadków), do którego zalicza się rak wielkokomórkowy, gruczolowy i inne (9). Ustalono, że wykrycie NSCLC na wczesnym stadium rozwoju (I stopień zaawansowania klinicznego) skutkuje pięcioletnim przeżyciem u 70% pacjentów. Niestety często rak

ten jest wykrywany w zaawansowanym stadium (IIIb i IV) i jedynie 1% chorych przeżywa po diagnozie 5 lat. Niskie 5-letnie przeżycie dotyczy również chorych w stadium zaawansowania choroby IIIa (15%) (10). W związku z tym tak ważne są regularne badania grup ryzyka oraz poszerzanie wiedzy w zakresie doboru optymalnej terapii, aby zwiększyć przeżywalność pacjentów u których doszło do rozwoju tego raka.

1.2 Podłoże genetyczne rozwoju raka płuca.

Udowodniono, że rozwój nowotworu w organizmie, w tym raka płuca, jest spowodowany określonymi zmianami w materiale genetycznym komórek somatycznych, przez które traci ona swoje fizjologiczne funkcje i zaczyna zachowywać w sposób niezależny od organizmu. Takie zmiany nazywane są podłożem molekularnym nowotworu. Obejmują one nagromadzenie w komórce zmian genetycznych i epigenetycznych, wśród których zwykle wyróżnia się inaktywację genów supresorowych oraz aktywację onkogenów. Znaczący wpływ na rozwój nowotworu ma tryb życia osoby, środowisko, predyspozycje rodzinne, a proces zwykle zajmuje wiele lat.

Utrata przez prawidłową komórkę wrażliwości na zewnętrzne sygnały, kontrolujące podziały oraz wzrost komórkowy, jest uznawana za transformację nowotworową komórki i stanowi początkowy etap rozwoju każdego nowotworu. Jej podstawę stanowi pojawienie się nieprawidłowości w genomie, które powodują uszkodzenie regulujących cykl komórkowy procesów. Na dalszych etapach rozwoju nowotworu, podczas progresji, w transformowanych komórkach następuje dalsze nagromadzenie zmian genetycznych i epigenetycznych, prowadzących ostatecznie do głębokich zmian w fizjologii oraz morfologii. Wiąże się to między innymi z nabyciem zdolności do tworzenia inwazyjnej formy nowotworu i potencjału do dawania odległych przerzutów (11; 12; 13). Obecnie zostały zidentyfikowane setki zmian w genomie komórek, odpowiedzialnych za rozwój różnych rodzajów nowotworów zarówno u człowieka, jak i zwierząt.



Rycina 1. Podłoże genetyczne raka płuca.

Istotną cechą komórek nowotworowych jest zdolność przetrwania w warunkach, które byłyby bardzo szkodliwe lub nawet letalne dla komórek prawidłowych. Takie warunki są określane terminem stresu komórkowego. Wyróżniane są wiele rodzajów stresu komórkowego, w tym, stres oksydacyjny, nadmierne skrócenie telomerów chromosomowych, nagromadzenie w komórce szkodliwych produktów metabolizmu, znaczące uszkodzenie DNA, niedotlenienie komórek lub oddziaływanie na komórkę innych szkodliwych czynników. Komórki posiadają bardzo rozbudowane i aktywne mechanizmy, chroniące je przed różnymi formami stresu. Działanie tych mechanizmów jest jednak ograniczone i w przypadku zbyt dużego uszkodzenia komórki zostają uruchomione procesy, które prowadzą do jej wyeliminowania. W odróżnieniu od komórek prawidłowych komórki nowotworowe charakteryzują się znacznie zwiększoną odpornością na różne rodzaje stresu komórkowego, co pozwala im na przetrwanie w warunkach skrajnie szkodliwych.

W wielu przypadkach znane są podstawy molekularne nabycia przez komórki nowotworowe oporności na stres komórkowy. Są to zmiany genetyczne i epigenetyczne, które prowadzą do zaburzenia mechanizmów, kontrolujących apoptozę i inne rodzaje autodestrukcji komórki, oraz znacząco zwiększają aktywność komórkowych układów antystresowych.

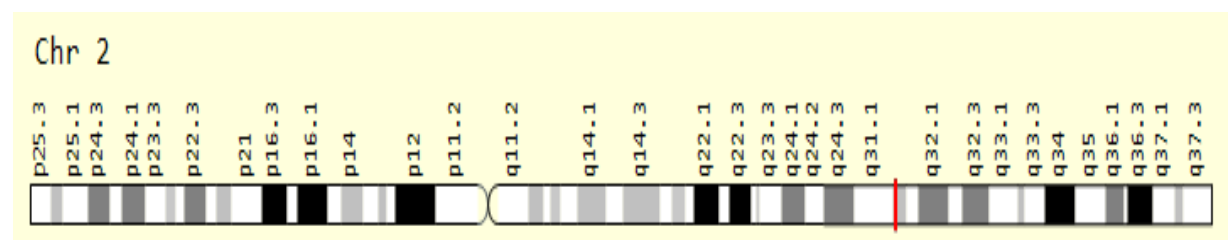
Wśród znanych komórkowych układów antystresowych istotną rolę w utrzymaniu homeostazy komórkowej odgrywa białko NRF2, odpowiedzialne za unieszkodliwienie różnorodnych czynników oksydacyjnych, które powstają w komórce zarówno podczas prawidłowego funkcjonowania, jak i w warunkach

stresowych. Białko NRF2 jest kluczowe dla aktywacji rozbudowanego układu antyoksydacyjnego, składającego się w wielu enzymów i innych substancji o aktywności przeciwutleniaczy. Cechą charakterystyczną komórek nowotworowych jest ich zdolność do przetrwania w warunkach bardzo wysokiego poziomu stresu oksydacyjnego (16). Ten wysoki poziom stresu może być wywołany niedotlenieniem, często występującym w komórkach nowotworowych, jak również terapią przeciwnowotworową, zastosowaną u pacjenta (14). Badania nowotworów wielu typów wykazały, że oporność komórek nowotworowych na stres oksydacyjny może być związana z nadmierną aktywacją białka NRF2. Liczne przypadki zaburzonego funkcjonowania NRF2 w komórkach transformowanych zostały udokumentowane (17).

1.3 Białko NRF2

1.3.1 Krótka charakterystyka NRF2

Białko NRF2 jest czynnikiem transkrypcyjnym, kodowanym przez gen *NFE2L2*. Gen *NFE2L2* został zmapowany w krótkim ramieniu chromosomu drugiego w prążku cytogenetycznym 2q31.2 i składa się z 174 090 par zasad (15). Jego położenie jest zaznaczone na rycinie 2.



Rycina 2. Położenie *NFE2L2* na chromosomie drugim (14).

Białko NRF2 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych typu zamka leucynowego (bZip). Jako czynnik transkrypcyjny NRF2 ma zdolność do przyłączania się do DNA i aktywacji ekspresji genów, zawierających w swoich promotorach sekwencje regulatorowe, zwane elementami odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE). Sekwencja ARE została zidentyfikowana w wielu genach, kodujących enzymy i inne białka, których funkcją jest zwalczanie stresu oksydacyjnego.

1.3.2 Ujęcie stresu oksydacyjnego w organizmie.

W realnym środowisku, komórki każdego organizmu są stale narażone na działanie różnych czynników pochodzenia zarówno zewnętrznego, jak i wewnętrznego, zaburzających równowagę metaboliczną i prowadzących do stresu oksydacyjnego. Charakteryzuje się on nadmiernym gromadzeniem w komórce substancji o właściwościach utleniających, nazywanych oksydantami. Do głównych przyczyn stresu oksydacyjnego należą nasilenie metabolizmu wewnątrzkomórkowego, upośledzenie mechanizmów odpowiadających za neutralizację czynników utleniających lub działanie czynników środowiska zewnętrznego takich jak zanieczyszczone powietrze, promieniowanie

nadfioletowe (UV), promieniowanie jonizujące, metale ciężkie, dym tytoniowy, ale również efekt wielu leków przeciwnowotworowych (16).

Wśród licznych substancji komórkowych, które mogą spowodują stres oksydacyjny, najistotniejszymi uważa się reaktywne formy azotu (NOS) (np. NO, NO₂), wolne rodniki tlenowe (ROS) (w tym anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy), a także inne formy tlenu niebędące rodnikami np. tlen singletowy, nadtlenek wodoru lub ozon (16). Substancje te charakteryzują się dużym potencjałem reakcyjnym, oddziałują z wieloma składnikami komórkowymi, uszkodzając ich strukturę i funkcjonowanie. Niewielkie ilości oksydantów NOS i ROS są stale produkowane w komórce jako efekt uboczny metabolizmu oraz skutecznie neutralizowane za pośrednictwem mechanizmów antyoksydacyjnych. W wielu warunkach patologicznych obserwuje się natomiast wzmożoną produkcję NOS, ROS i innych utleniaczy, prowadzącą do pojawienia się stresu oksydacyjnego. Przykładami takich sytuacji są stan zapalny lub reperfuzja tkanki po okresie niedotlenienia.

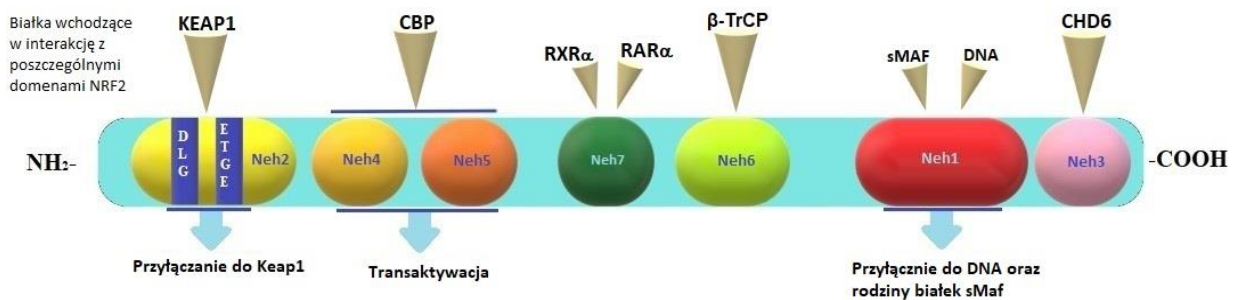
Fizjologiczną odpowiedzią komórki na stres oksydacyjny jest aktywacja czynników o działaniu antyoksydacyjnym, która w znacznym stopniu jest związana z dodatkową skoordynowaną syntezą różnorodnych enzymów i innych białek, uczestniczących w reakcjach neutralizacji oksydantów. Kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za indukcję syntezy tych białek jest czynnik transkrypcyjny NRF2 (17). Aktywacja NRF2 w warunkach stresu oksydacyjnego została udowodniona w wielu badaniach, zaczynając od roku 1994, kiedy czynnik ten został po raz pierwszy wyizolowany (18). Od tego momentu trwają intensywne prace nad poznaniem mechanizmów molekularnych funkcjonowania NRF2 oraz jego udziału w patogenezie nowotworów i innych chorób.

1.3.3 Budowa NRF2.

NRF2 należy do niewielkiej rodziny czynników transkrypcyjnych „Cap'n'Collar” z motywem zamka leucynowego (CNC-bZIP) (17). Białka z tej rodziny mają zdolność do przemieszczania się z i do jądra komórkowego, dimeryzacji oraz przyłączania się do jądrowego DNA. Do rodziny tych białek należą również czynniki NRF1 (18), NRF3 (19), Nf-E2 p45 (20), inne białka z domeną BTB (np. Broad-Complex, Tramtrack) oraz homologi CNC – Bach1, Bach2 (21).

Głębsza analiza strukturalna wykazała, że NRF2 składa się z 7 domen, nazywanych Neh1 do Neh7, z których każda jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania czynnika transkrypcyjnego. Budowa NRF2 została przedstawiona na rycinie 3. Neh1 zawiera w swojej budowie motyw CNC-bZIP, który umożliwia wiązanie się białka z regionem promotorowym DNA oraz do oddziaływanie z małym białkiem sMAFs i utworzenia aktywnego heterodimera (22). Domeny Neh3, 4 oraz 5 są zaangażowane w aktywację NRF2 poprzez wiązanie się z aktywatorami transkrypcji. Domeny Neh4 i Neh5 są miejscem przyłączenia się do białka wiążącego (CBP) aktywator elementu odpowiedzi cyklicznego monofosforanu adenozyliny (CREB) (23). Neh3 łączy się z białkiem wiążącym chromo-ATPase/helikazę DNA (CHD6) (24). Domena Neh5 zawiera również sygnał eksportu

jądrowego (NES), niezbędny w transporcie NRF2 z jądra komórkowego do cytoplazmy (25). Domeny Neh2 i Neh6 są zaangażowane w negatywną regulację białka poprzez ubiquitylizację i proteasomalną degradację. Ponadto, Neh2 zawiera dwa specyficzne motywy aminokwasowe – DLG i ETGF. Są one odpowiedzialne za łącznie się NRF2 ze swoim głównym negatywnym regulatorem – białkiem KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Pomiędzy motywami DLG a ETGF znajdują się 7 reszt lizynowych, które umożliwiają połączenie się NRF2 z kompleksem ligaz (CUL3-RBX1-based E3 ubiquitin ligase complex) odpowiedzialnym za ubiquitylizację (26; 27). Indukcja degradacji NRF2 z pominięciem KEAP1 jest możliwa dzięki fosforylacji reszt aminokwasowych w domenie Neh6 za pomocą kinazy syntetazy glikogenu 3 (GSK-3). Neh6 zawiera w swojej strukturze dwa peptydowe motywy – DSGIS i DSAPGS, łączą się one z białkiem zawierającym powtórzenia β -transdukuje (β -TrCP) co prowadzi NRF2 na drogę ubiquitylizacji ligazą ubiquityny E3 (28; 29; 30; 31). Domena Neh7 jest domeną represyjną, swoją funkcję spełnia dzięki łączeniu z receptorem α retinoidu X (RXR α) oraz receptorem α kwasu retinowego (RAR α) (32).



Rycina 3. Struktura NRF2.

1.3.4 Mechanizmy regulacji aktywności NRF2.

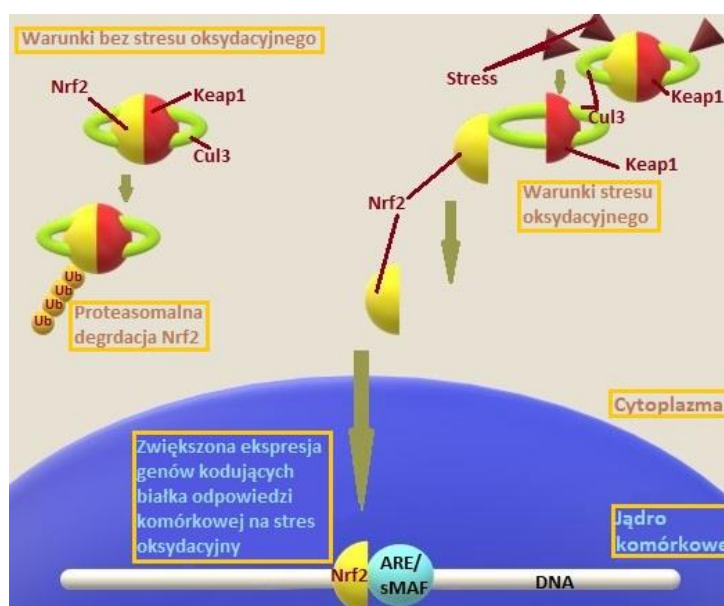
Ze względu na bardzo istotną rolę NRF2 w utrzymaniu homeostazy komórkowej i przeciwdziałaniu stresu oksydacyjnemu, aktywność białka jest precyzyjnie regulowana na różnych etapach jego syntezy i funkcjonowania za pośrednictwem wielu czynników komórkowych. Białko znajduje się zarówno pod kontrolą pozytywną, jak i negatywną, aczkolwiek zgodnie z obecną wiedzą, kluczową rolę w regulacji aktywności NRF2 i, odpowiednio, całego układu antyoksydacyjnego komórki odgrywa białko KEAP1.

1.3.5 Regulacja aktywności NRF2 za pomocą KEAP1.

W warunkach fizjologicznych, poziom aktywności białka NRF2 w komórce jest bardzo niski z powodu krótkiego czasu jego półtrwania, który wynosi ok. 20

minut (33; 34). Białko szybko ulega degradacji w cytoplazmie poprzez układ ubikwityna - proteasom (35). Stabilność i w konsekwencji akumulacja NRF2 jest w głównej mierze regulowana przez białko KEAP1, które wiąże się i aktywuje kompleks ligazy ubikwityny CUL3-RBX1-E3 (27). KEAP1 jest negatywnym regulatorem NRF2, co zostało udowodniono w eksperymentach na myszach laboratoryjnych. W doświadczeniu wykazano, że myszy z wyłączonym genem kodującym KEAP1 (*KEAP1*-knockout) miały bardzo wysoki poziom białka NRF2 (36; 37). Stwierdzono, że przyłączenie KEAP1 do NRF2 prezentuje NRF2 do ubikwitylizacji przez ligazę CUL3-RBX1-E3 i następnie degradacji w proteosomach. Ścieżka sygnałowa NRF2-KEAP1 została przedstawiona na rycinie 4. Badania nowotworów w kolejnych latach wykazały, że w komórkach nowotworowych często występuje nadmierna aktywność NRF2, spowodowana niedoborem białka KEAP1 (38).

Zaproponowany został możliwy model regulacji aktywności NRF2 przez KEAP1, opisany jako tzw. kod cysteinowy. Kod cysteinowy opiera się na trzech krytycznych resztach cysteinowych w pozycjach 151, 273 oraz 288 KEAP1 (39; 40), które decydują o utworzeniu kompleksu KEAP1 -NRF2 i dalszych losach NRF w komórce. Modyfikacje tych krytycznych cystein prowadzą do zmiany konformacji układu KEAP1-NRF2-CUL3 i jego rozpadu (41), co skutkuje stabilizacją i nagromadzeniem NRF2 w komórce. Stwierdzono, że modyfikacje te występują w warunkach stresu oksydacyjnego, prowadząc do aktywacji NRF2. Między innymi endogenne metabolity alkenów redukują cysteinę w pozycji 273 oraz 288, natomiast sulforafany i tert-butylohydrochinon (tBHQ) redukują Cys151 (40; 42; 43). NRF2 nie jest degradowany i jest kierowany do jądra komórkowego, gdzie tworzy dimery z małym białkiem z rodziny czynników transkrypcyjnych b-ZIP sMAF i przyłącza się do sekwencji ARE w docelowych genach, chroniących komórkę przed stresem oksydacyjnym, nasilając transkrypcję tych genów (22; 44).



Rycina 4. Ścieżka sygnałowa NRF2-KEAP1.

1.3.6 Regulacja aktywności NRF2 na poziomie transkrypcji.

Stabilizacja NRF2 jest uznawana za najistotniejszy, ale nie jedyny mechanizm molekularny aktywacji białka i uruchomienia odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny. Są dowody nasilenia syntezy nowych cząsteczek czynnika. Do tej pory aktywacja syntezy NRF2 na poziomie transkrypcji została zbadana jedynie przez jeden zespół naukowców. Wykazali oni, że aktywacja onkogenów *KRAS* (ang. *Kirsten rat sarcoma virus*), *BRAF* (ang. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) oraz *MYC* może prowadzić do zwiększenia wytwarzania mRNA NRF2 (45). Szczegółowy mechanizm molekularny nie został dotychczas poznany. Przypuszcza się, że produkty białkowe onkogenów mogą wiązać się sekwencjami regulatorowymi w promotorze *NRF2* i w ten sposób zwiększać transkrypcję genu (45).

1.3.7 Regulacja aktywności NRF2 na poziomie translacji.

Są dowody regulacji syntezy NRF2 również na poziomie translacji. W proces inicjacji translacji zaangażowany jest region 5' UTR (ang. *5' untranslated region*) mRNA *NRF2* oraz miejsce rozpoznawania rybosomu (IRES) (46). Wykazano, że podwyższone stężenie oksydantów nadtlenu wodoru oraz sulforafanu w komórce zwiększa dostępność miejsc IRES w mRNA *NRF2* dla rybosomów, prowadząc do nasilenia jego translacji na drodze IRES-zależnej (46).

1.3.8 Potranslacyjna regulacja aktywności NRF2.

Istotny wpływ na aktywność NRF2 mają również posttranslacyjne modyfikacje białka. Główną drogą posttranslacyjnej regulacji aktywności NRF2 jest fosforylacja, którą można wykryć za pomocą przeciwciał fosforylacja-swoistych, oznaczanie radioaktywnym fosforem ³²P oraz spektrometrii masowej (47; 48). Wykryto liczne miejsca fosforylacji w białku NRF2. Wpływ fosforylacji na stabilność i aktywność białka nie jest jednoznaczny. Wiele badań skupiało się na zidentyfikowaniu enzymów, katalizujących fosforylację NRF2. Do poznanych kinaz należą kinaza proteinowa C (PKC) (48; 49; 50), kinaza GSK-3 (51; 52; 53; 54), kinaza 3-fosfoinozytydu (PI3K) (55), kinazy aktywowane mitogenami (MAPKs) (56), kinaza białkowa siateczki śródbłonkowej (PERK) (57). Efekty jakie poszczególne kinazy wywierają na losy NRF2 w komórce przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Efekty jakie wywierają poszczególne kinazy na NRF2.

Substancja regulująca fosforylację	Efekt wywierany na NRF2	Skutek działania	Piśmiennictwo
PKC	Fosforylacja następuje w domenie Neh2 (Ser40). Powoduje to rozpad kompleksu NRF2-KEAP1 oraz zaaktywowanie NRF2.	Aktywacja NRF2	(48; 49; 50)
GSK-3	Fosforylacja następuje w domenie Neh6. Prowadzi do degradacji NRF2 niezależnie od KEAP1. PI3K zmniejsza działanie GSK-3.	Inhibicja NRF2	(51; 52; 53; 54)
PI3K	Zwiększa akumulację NRF2 w jądrze komórkowym, a co za tym idzie, zwiększa ekspresję genów zawierających sekwencję ARE.	Aktywacja NRF2	(55)
MAPKs	W zależności od poszczególnych cząsteczek z rodziny. Dwie z nich (ERK2, JNK1) aktywują NRF2 oraz zwiększają ekspresję genów zawierających sekwencję ARE. Jedna (p38) hamuje aktywność NRF2.	Aktywacja NRF2/ Inhibicja NRF2	(56)
PERK	Zwiększa akumulację NRF2 w jądrze komórkowym jedynie w trakcie stresu oksydacyjnego. Zwiększa ekspresję genów zawierających sekwencję ARE.	Aktywacja NRF2 w warunkach stresu komórkowego	(57)

1.3.9 Epigenetyczna regulacja aktywności NRF2.

Aktywność NRF2 w komórce jest również regulowana za pośrednictwem mechanizmów epigenetycznych, które obejmują metylację promotora genu, modyfikacje histonów chromatyny w obrębie genu oraz działanie mikroRNA na transkrypty (miRNAs) (58). Metylacja DNA polega na przeniesieniu grupy metylowej na pozycję 5' cytozyny dinukleotydów CG, wchodzących w skład wysp CpG, przez enzym metylotransferazę DNA (DNMTs) (59; 60). Podobnie jak w przypadku innych genów, zawierających wyspy CpG w swoich promotorach, metylacja promotora *NFE2L2* prowadzi do zmian w strukturze chromatyny, które uniemożliwiają transkrypcję genu. Zaburzenie procesów metylacji są często wykrywane w nowotworach różnych typów. Udowodniono, że nadmierna metylacja wysp CpG stanowi jedną z przyczyn wyciszenia aktywności genów supresorowych (58; 61; 62; 63; 64).

Według współczesnej wiedzy, w regulacji procesu ekspresji genów bardzo istotną rolę odgrywają niekodujące regulatorowe cząsteczki RNA, przede wszystkim mikroRNA. Wśród różnorodnych mechanizmów ich działania, szczególnie wyróżnia się hamujący wpływ na proces translacji poprzez indukcję degradacji dojrzałych transkryptów w cytoplazmie (65). W najnowszych badaniach wykazano iż miRNA może mieć dwojaki wpływ na rozwój i progresję chorób nowotworowych. Z jednej strony niedobór miRNA w komórkach nowotworowych będzie powodował ich powolniejszy wzrost i spowolni progresję choroby, z drugiej natomiast, zwiększona ilość miRNA w komórkach nowotworowych będzie prowadziła do przyśpieszonej progresji choroby (66; 67; 68; 69). Zostały opisane miRNA komórkowe, które uczestniczą w regulacji ekspresji genów NRF2 i KEAP1, i w ten sposób mają wpływ na odpowiedź komórki na stres oksydacyjny. Cząsteczki te są znane pod nazwą redox-wrażliwych miR (70; 71). Jako przykład można przytoczyć dane dla raka śluzowo-naskórkowego płuca. W komórkach nowotworowych raka za aktywowanie czynnika NRF2 są odpowiedzialne między innymi miR-181a, miR-193b oraz miR-424, a za hamowanie aktywności – miR378 (72).

U pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML) wykryto zwiększone ilości miR-144-3p oraz miR-28, a także zmniejszoną ilość NRF2 (73). Badania na liniach komórkowych HL-60 oraz HEK293 wykazały że miR-34a, miR144 oraz miR-28 powodują degradację mRNA *NRF2* poprzez region 3'UTR promotora *NRF2*. Ponadto zwiększony poziom tych miRNA zwiększa odporność komórki na apoptozę (73; 74; 75; 76).

W komórkach nowotworu sutka (BRCA) stwierdzono iż miR-200a jest odpowiedzialny za aktywację ścieżki sygnałowej NRF2 poprzez nadmierną degenerację mRNA *KEAP1* (77). Ponadto wzrost stężenia miR-200a, a co za tym idzie, nadmierna aktywacja NRF2 powoduje przyśpieszenie dojrzewania komórek dendrytycznych (78). Badania przeprowadzone na liniach komórkowych neuroblastomy (SH-SY5Y) wykazały że spadek mRNA *NRF2* jest spowodowany

przez 4 miRNA – miR27a, miR-142-5, miR-144, miR-153. Skutkuje to znacząco zredukowaną syntezą glutationu w tych komórkach (79).

miR-432 ma zdolność do łączenia się z kodującą sekwencją mRNA *KEAP1* i jej modyfikacji. Prowadzi to do zmian w konformacji dojrzałej cząsteczki *KEAP1* i uniemożliwia jego łączenie się z NRF2. Cząsteczki NRF2 przedostają się do jądra komórkowego, gdzie zwiększają ekspresję genów białek docelowych. Skutkiem tego jest zwiększona odporność komórek nowotworowych na leczenie antynowotworowe poprzez wywołanie stresu oksydacyjnego w komórce, np. leczenie cisplatyną (80).

W komórkach nowotworowych niskie stężenia NRF2 aktywują, między innymi, drogę sygnałową, aktywującą czynnik transkrypcyjny NF kappa B (NF-κB), prowadząc do nadmiernej syntezy miR-181. Skutkuje to zaburzeniami w homeostazie mitochondrialnej, ponieważ miR-181c hamuje ekspresję oksydazy cytochromu C (81).

Ustalono, że nadekspresja mRNA NRF2 podczas kancerogenezy jest, w dużej mierze, spowodowana przez miR-27a (79), miR-28 (75), miR-93 (76), miR-142-5p (79), miR-144 (74), miR-153 (79), miR-193b (82), miR-365-1 (82). Skutkiem tego jest nagromadzenie się czynnika NRF2 w jądrze komórkowym i nadmierna ekspresja genów jego białek docelowych. Dzięki temu komórka nowotworowa jest w stanie szybciej rosnąć niż komórka prawidłowa, a także przetrwać w permanentnym stresie oksydacyjnym. W jednym z badań zostało ustalono, że wysoki poziom *BRCA1* w fibroblastach płuc oraz zastosowanie radioterapii skutkuje zmniejszeniem poziomu *KEAP1*, w wyniku czego cząsteczki NRF2 gromadzą się w jądrze komórkowym i aktywują transkrypcję docelowych genów. Jednym ze skutków aktywacji jest zwiększenie poziomu mikroRNA miR-141, zwiększona migracja komórek oraz ich odporność na stres oksydacyjny (83). Również badania na komórkach raka wątrobowokomórkowego dowiodły, że wysoki poziom miR-141 zwiększa akumulację NRF2 w jądrze komórkowym poprzez zmniejszenie ilości białka *KEAP1* (83). Inne badanie na tych samych liniach komórkowych wykazały, że również zwiększenie poziomu miR-340 prowadzi do nagromadzenia NRF2 w jądrze komórkowym, co ma duży wpływ na uodpornienie się komórek nowotworowych na terapię 5-fluorouracylem i cisplatyną (83; 84; 85).

NRF2 jako czynnik transkrypcyjny również może wpływać na transkrypcję miRNA, które z kolei kontrolują jego ekspresję. Docelowe dla NRF2 sekwencyjne elementy regulatorowe zostały wykryte w promotorach genów niektórych mikroRNA (82). W doświadczeniach z komórkami AML z wysokim poziomem NRF2 w wyniku wyłączenia genu *KEAP1* czynnik NRF2 miał wpływ na transkrypcję genów miR-125B1 oraz miR-29AB1. Skutkiem tej regulacji była zwiększona ekspresja miR-125b oraz zmniejszenie ekspresji miR-29b oraz zdolność komórek do przetrwania chemioterapii (86). Inne badania, oparte na mysich keratynocytach wykazały że NRF2 aktywuje ekspresję miR-29a/b, przyłączając się do promotora jego genu (89), w którym wykryto dwie sekwencje regulatorowe ARE (86).

1.3.10 Wpływ innych białek na aktywność NRF2.

Niedawne badania wykazały, że KEAP1 nie jest jedynym białkiem, które uczestniczy w regulacji aktywności NRF2. Wykryto, między innymi, wpływ białka IQGAP1 (ang. *IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1*) na stabilność NRF2 oraz jego zdolność do przyłączania się do DNA (87; 88). IQGAP1 jest białkiem, biorącym udział w adhezji międzykomórkowej i gospodarce wapniowej organizmu. Jest niezbędne dla powstania prawidłowego cytoszkieletu komórkowego (89). Udowodniono, że IQGAP1 jest pozytywnym regulatorem aktywności NRF2 poprzez zwiększenie jego stabilności oraz powinowactwa do DNA (87).

Kolejnym białkiem mającym znaczący wpływ na stabilność NRF2 jest białko p62 (znane jako SQSTM1, ang. *sequestosome 1*). Bierze ono udział w autofagocytocie, regulując powstawanie kompleksów białkowych (90). Białko to współzawodniczy z NRF2 o miejsce wiązania się z KEAP1 (91; 92; 93; 94), zwiększając w ten sposób stabilność i odpowiednio aktywność transkrypcyjną NRF2. Efekt działania SQSTM1 może być zwiększony poprzez działanie arsenu (92; 95).

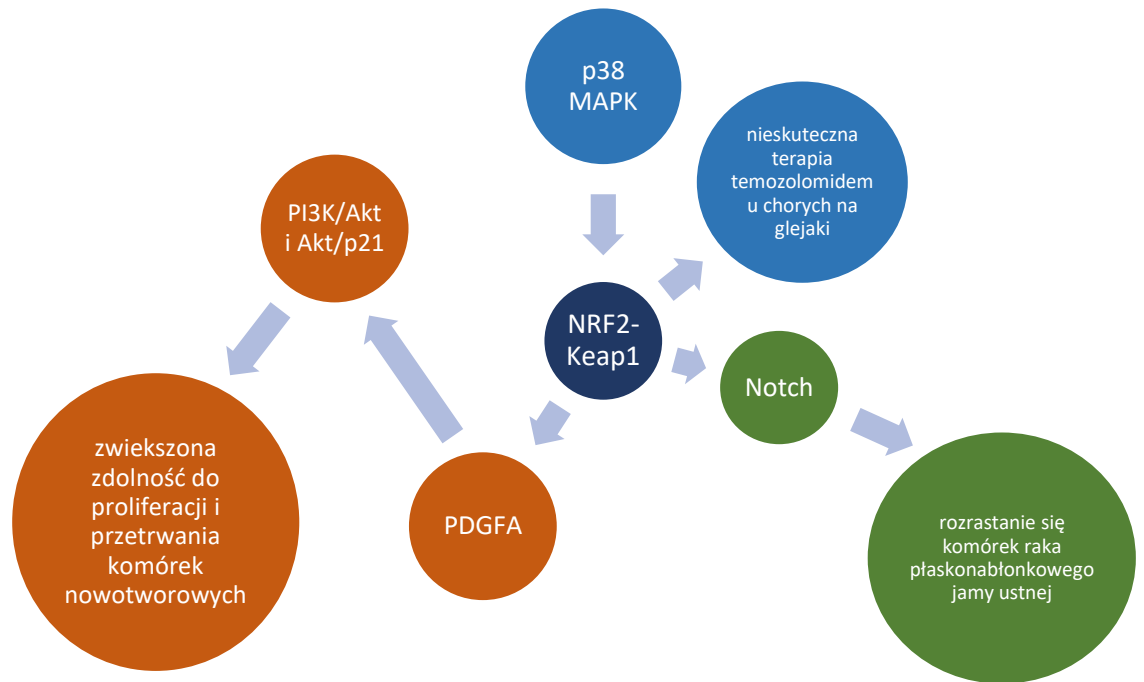
1.3.11 Powiązanie innych komórkowych ścieżek sygnałowych ze szlakiem NRF2-KEAP1.

Obecnie znanych jest kilka komórkowych ścieżek sygnałowych, które są istotne w regulacji proliferacji i wzrostu komórek i są powiązane z układem NRF2-KEAP1, co zostało przedstawione na rycinie 5. Są to ścieżki przekazywania sygnałów, kontrolowane przez kinazę p38 MAPK, czynnik transkrypcyjny NF- κ B, receptory NOTCH oraz kinazy białkowe Akt/p21 i PI3K/Akt.

W jednym z badań wykazano, że w glejakach aktywowana ścieżka sygnałowa p38 MAPK prowadziła do nadmiernej aktywacji NRF2 i zwiększonej ekspresji jego genów docelowych, co skutkowało niewrażliwością chorych na terapię temozolomidem (96).

Ustalono również, że NRF2 aktywuje szlak NOTCH poprzez zwiększenie ekspresji genów *NOTCH1* i *HES1* oraz genu *PCNA*, kodującego antygen jądrowy komórek proliferujących (PCNA) w komórkach raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, znacznie przyspieszając ich podziały (97).

Wśród genów docelowych czynnika transkrypcyjnego NRF2 znajduje się gen płytkowego czynnika wzrostu A (PDGFA), co prowadzi do aktywacji ekspresji *PDGFA* w warunkach stabilizacji i gromadzenia się NRF2. Zwiększona ilość czynnika wzrostu aktywuje dwie ścieżki sygnałowe, kontrolowane przez kinazy PI3K/Akt oraz Akt/p21, zwiększając w ten sposób proliferację oraz zdolności do przetrwania komórek nowotworowych (98; 99; 100)

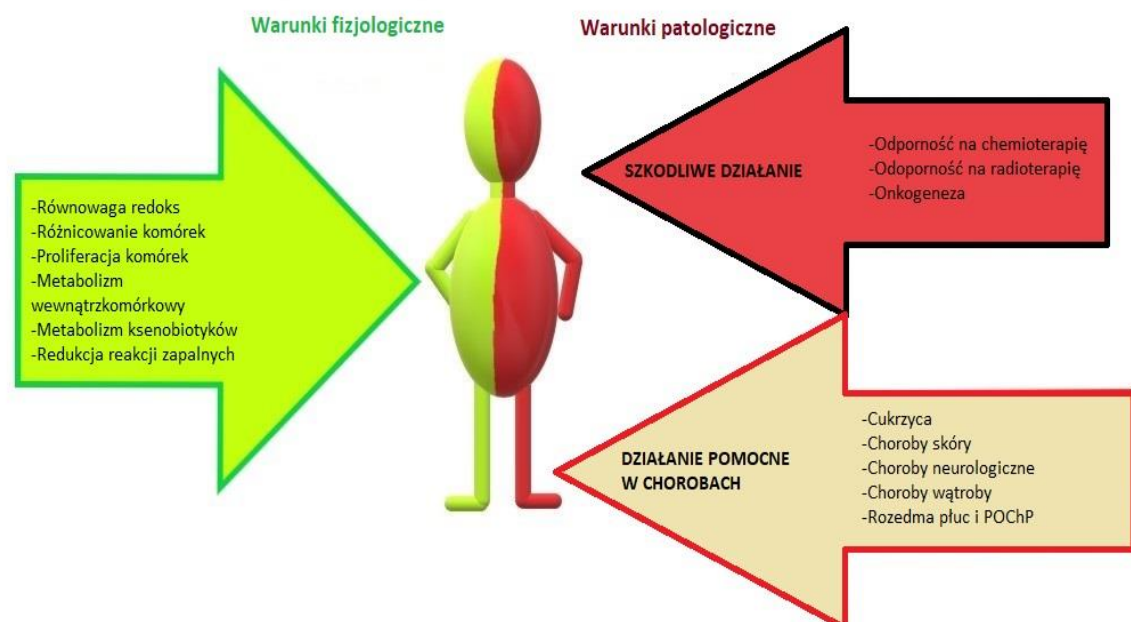


Rycina 5. Powiązanie innych ścieżek sygnałowych i szlaku NRF2-KEAP1.

Jak zostało przedstawione wyżej, stabilność i aktywność NRF2 w komórce jest kontrolowana przez wiele czynników, a niektóre z tych czynników tworzą z NRF2 układy typu tzw. pętli zwrotnej. Wskazuje to pośrednio na istotność roli, jaką NRF2 pełni w organizmie. Przez wiele lat wydawało się, że białko NRF2 stanowi zbawienie dla organizmu w przeciwdziałaniu stresu oksydacyjnemu, dotyczącemu jego komórki każdego dnia. Najnowsze badania wskazują jednak, że działanie NRF2 nie zawsze jest korzystne i w niektórych warunkach czynnik ten odgrywa rolę negatywną.

1.4 Rola biologiczna czynnika transkrypcyjnego NRF2.

Przez wiele lat po odkryciu NRF2 naukowcy uważali je za białko, chroniące nasze komórki przed różnymi czynnikami, zdolnymi do wywołania stresu komórkowego i w ten sposób zapobiegające rozwojowi wielu chorób. Udział NRF2 w zapobieganiu oraz spowolnieniu procesów patologicznych w wielu chorobach został udowodniony w licznych badaniach. Wybitny przykład stanowią choroby nowotworowe i rola NRF2 w zapobieganiu transformacji nowotworowej komórek pod wpływem różnego rodzaju oksydantów. Późniejsze badania wykazały jednak dwojaką rolę tego czynnika transkrypcyjnego. Udowodniono zostało, że w nowotworach nadmierna aktywność NRF2 nie tylko zwiększa zdolność komórek do przeżycia w warunkach stresu komórkowego, ale również czyni je opornymi na wiele rodzajów stosowanej terapii przeciwnowotworowej (33; 101). Jego dwojaka rola została zaprezentowana na rycinie 6.



Rycina 6. Rola NRF2.

1.4.1 Rola NRF2 w warunkach fizjologicznych.

W warunkach fizjologicznych NRF2 bierze udział w wielu procesach zachodzących w organizmie. Głównie odpowiada za utrzymanie homeostazy komórkowej. Uczestniczy w metabolizmie komórkowym, odpowiedzi zapalnej organizmu jak również utrzymaniu stresu oksydacyjnego na poziomie, niezagrażającym komórce.

1.4.1.1 Udział NRF2 w metabolizmie.

Tuż po odkryciu NRF2 uważano, że jego rola sprowadza się do ochrony komórek przed antyoksydantami. Nowe badania dowodzą że bierze ono również udział w regulacji metabolizmu komórkowego. Ustalono, że niektóre z genów, kodujących enzymy, zawiera w swojej sekwencji miejsca ARE, w związku z czym ich ekspresja znajduje się pod pozytywną kontrolą NRF2. Są to między innymi dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa oraz dehydrogenaza jabłczanowa (102). Wzrost stężenia tych enzymów w komórce skutkuje zwiększeniem metabolizmu glukozy, kwasów tłuszczowych, wzrostem produkcji nukleotydów oraz spowolnieniem produkcji wewnątrzkomórkowej kwasów tłuszczowych. Aktywacja tych procesów zwiększa tempo wzrostu komórki oraz intensywność jej podziałów, sprzyjając między innymi rozwojowi nowotworu (103; 104). Co więcej, wzrost ilości aktywnego NRF2 zmniejsza ilości receptorów alfa, aktywowanych przez proliferatory peroksosomów (PPAR α), dzięki czemu komórka jest w stanie przetrwać w stanie długotrwałego niedożywienia (105).

NRF2 ma również swój udział w metabolizmie ksenobiotyków. Wiele genów enzymów, uczestniczących w fazie drugiej ich przemiany, zawiera w swoich sekwencjach elementy ARE. Są wśród nich sulfotransferazy, S-transferazy glutationu oraz dehydrogenazy UDP-glukozy. Dzięki nim toksyczne, zazwyczaj słabo rozpuszczalne w wodzie związki są przekształcane w mniej toksyczne i lepiej rozpuszczalne w wodzie. Ochronia to całą komórkę, a w szczególności, wrażliwe na uszkodzenia DNA (95; 104) i stanowi przykład pozytywnego wpływu na oporność komórek przed transformacją nowotworową.

1.4.1.2 Rola NRF2 w reakcjach zapalnych organizmu.

Ustalono, że ekspresja niektórych z białek, biorących udział w reakcjach zapalnych, również znajduje się pod kontrolą transkrypcyjną czynnika transkrypcyjnego NRF2. Są to między innymi przeciwzapalne interleukiny, np. IL-13, IL-4 (106; 107). Wykazano, że pod wpływem NRF2 dochodzi do zmniejszenia produkcji reaktywnych form tlenu spowodowanych przez IL-6 oraz wytwarzania czynnika martwicy nowotworu (TNF α), które wywołują silne reakcje zapalne (108; 109). Ponadto NRF2 hamuje produkcję cytokin prozapalnych - chemokiny 2 i białka zapalnego makrofagów (108; 109). Spadek ilości receptora PPAR α , wywołany przez NRF2, również ma działanie ochraniające tkankę przed reakcją zapalną (105).

1.4.1.3 Rola NRF2 w utrzymywaniu redoks-homeostazy.

Czynnik transkrypcyjny NRF2 uważany jest za główny regulator balansu redoks w komórce. Jego działanie polega na nasileniu transkrypcji wielu genów, kodujących enzymy oraz białka, odpowiedzialne za utrzymanie równowagi redoks. Należą do nich praktycznie wszystkie główne enzymy antyoksydacyjne – dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa, dehydrogenaza NAD(P)H [chinon] 1, oksygenaza hemowa 1 oraz białko – glutation i inne (57).

1.4.1.4 Rola NRF2 w proliferacji i różnicowaniu komórkowym.

Na wzrost i różnicowanie komórek ma wpływ, między innymi, stężenie reaktywnych form tlenu, pośrednio regulowane przez NRF2. Udowodniono iż duże ilości ROS w młodych neuronach znacząco obniżają tempo ich wzrostu, blokując szlaki sygnałowe JNK oraz Wnt (110). Nadmiar NRF2 w kościach również działa szkodliwie. Hamuje on czynnik transkrypcyjny 2 związany z Runt (RUNX2), zmniejsza ilości ROS co w konsekwencji zaburza różnicowanie osteoblastów oraz osteoklastów (111). Podczas badań na samcach myszy z wyłączonym genem *NFE2L2* zaobserwowano defekt spermatogenezy. Udowodniono, że nadmiar ROS w rozrodczych komórkach macierzystych obniża płodność (112). Do regeneracji wątroby niezbędne są białka kodowane przez *Herp1*, *Notch1*, *p21*, *Hes1*, natomiast indukcja ich ekspresji zostaje pod ścisłą kontrolą NRF2 (113). Kolejne 2 geny, również aktywowane przez NRF2, *PPAR γ* oraz *CEBP β* , wpływają na spowolnienie rozwoju i różnicowania adipocytów (114).

1.4.2 Rola NRF2 w warunkach patologicznych.

NRF2 pełni funkcję ochronną, zmniejszając toksyczność leków podawanych pacjentowi w wielu tkankach – nerkach, wątrobie, skórze, płucach, wątrobie oraz w całym układzie pokarmowym (115; 116; 117). Chroni w ten sposób prawidłowe komórki przed toksycznością leków podawanych na leczenie różnych chorób. Doświadczenie, przeprowadzone na myszach pozbawionych genu *NFE2L2* wykazało, iż myszy te są bardzo podatne na rozedmę płuc, do rozwinięcia której przyczynia się dym papierosowy (118). Co więcej wykazano znaczące zmniejszenie ilości NRF2 u pacjentów z rozpoznaną rozedmą płuc a także u chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP) (119).

Inne doświadczenie, na myszach pozbawionych genu *NFE2L2*, pokazało że NRF2 ma nie tylko wpływ na układ oddechowy ale także na układ nerwowy. U myszy tych wykryto wysoką apoptozę neuronów oraz zaburzenia neurologiczne. W dalszej perspektywie może to prowadzić do uszkodzenia mózgu i rdzenia kręgowego a także do pogorszenia motoryki organizmu (120; 121). Podanie doośrodkowo białka DEETGE-CAL-Tat ochrania neurony przed apoptozą wywołaną stresem oksydacyjnym (122).

Wiele chorób może być nasilana lub wywoływana przez promieniowanie ultrafioletowe UV-A oraz UV-B. Celem terapeutycznym, zapobiegającym zapaleniu wywoływanemu przez promieniowanie może być właśnie NRF2. Przy zwiększonej aktywności jest on w stanie bardzo dobrze ochronić komórkę przed szkodliwym promieniowaniem oraz jego skutkami (123; 124). Doświadczenie przeprowadzone na mysich wątrobach wykazało że NRF2 jest w stanie ochronić wątrobę przed toksynami, a w dalszej perspektywie przed ostrym i przewlekłym zapaleniem wątroby (125). Kolejne możliwe zastosowanie terapeutyczne NRF2 może mieć miejsce w leczeniu cukrzycy. NRF2 bierze udział w utrzymaniu prawidłowego poziomu glukozy w krwi (57). Dzięki prawidłowemu poziomowi glukozy można zapobiec powikłaniom cukrzycy takim jak kardiomiopatii (126), nefropatii (127) oraz retinopatii (128).

1.4.2.1 Rola NRF2 w nowotworach.

Rola NRF2 w nowotworach również może być postrzegana w dwojaki sposób. Z jednej strony aktywność białka chroni organizm przed rozwojem i progresją nowotworu, natomiast z drugiej, może spowodować szybszy rozrost tkanki nowotworowej oraz jej odporność na konwencjonalne metody leczenia, takie jak radio- i chemioterapia.

Dwojaki wpływ NRF2 w nowotworach jest związane z aktywnością i rolą biologiczną NRF2. Jego działanie antyoksydacyjne sprzyja zachowaniu integralności genomu, chroniąc komórki przed pojawieniem się mutacji, które mogą powodować transformację nowotworową oraz dalszą progresję nowotworu. Z drugiej strony, w komórkach nowotworowych, aktywność NRF2 sprzyja przeżyciu komórek w warunkach niesprzyjających, nasila ich reakcje anaboliczne oraz proliferację i wzrost. Szczególnie istotne znaczenie dla komórek transformowanych odgrywa nadmierna aktywacja NRF2, często obserwowana w różnych typach nowotworów.

Opisanych zostało wiele mechanizmów molekularnych, prowadzących do nadmiernej i często niekontrolowanej aktywności NRF2 w komórkach nowotworowych. Zgodnie ze stanem obecnej wiedzy, jednym z najistotniejszych mechanizmów jest pojawienie się mutacji w genach NRF2, stabilizujących białko oraz mutacji w najważniejszym partnerze NRF2 – białku KEAP1, które uniemożliwiają wiązanie się KEAP1 z NRF2 lub ligazą ubikwityny E3 i negatywną regulację aktywności czynnika transkrypcyjnego. Dodatkowo, ostatnio pojawiają się doniesienia o możliwych powiązaniach polimorficznych form NRF2 z aktywnością białka.

W jednym z niedawno opublikowanych badań wykazano mocny związek polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) w promotorze *NFE2L2* (rs6721961) z zwiększoną szybkością progresji nowotworu płuc u osób, które nigdy w życiu nie paliły tytoniu (118). Podobny związek wykazano również dla drugiego SNP (c.-617C/A). Jeden z wariantów polimorfizmu w układzie homozygotycznym u osób niepalących promował rozwój gruczolakoraka płuc (129).

W komórkach zaawansowanego raka płaskonabłonkowego przełyku z zmutowanym NRF2, wykryto wyższy poziom złośliwości oraz zwiększoną odporność komórek na leczenie radio- i chemioterapią (130).

Zwiększoną aktywność NRF2 wykryto w wielu tkankach objętych procesem nowotworzenia, w tym w endometrium (131), płucu (132) oraz trzustce (133). We wszystkich wymienionych tkankach, zwiększona aktywność NRF2 jest odpowiedzialna za odporność na chemioterapię.

Mutacje w KEAP1, powodujące utratę kontroli nad NRF2, również wykryto w wielu tkankach nowotworowych, między innymi w nowotworach głowy i szyi (134; 135), płuc (134; 136), piersi (137; 138), pęcherzyka żółciowego (139), wątroby (140), jajników (141), endometrium (142) oraz nowotwory skóry (143).

Od ponad 17 lat funkcjonuje projekt The Cancer Genome Atlas (TCGA), który zbiera dane oraz próbki tkanek od pacjentów z różnymi nowotworami. W trakcie tych 17 lat program scharakteryzował ponad 20 000 typów molekularnych nowotworów z 33 typów patomorfologicznych (144). W *NFE2L2* wykryto 196 miejsc mutacji, głównie występowały one w guzach płuc (101 przypadków na 327 wykrytych mutacji), macicy (79 na 327 wykrytych mutacji) oraz pęcherza moczowego (26 na 327 wykrytych mutacji) (145). Wśród wykrytych mutacji przeważały substytucje - 169 z 196 wykrytych mutacji, ponadto 22 małych delecji oraz 5 małych insercji (145). W genie *KEAP1* wykryto 339 miejsc mutacji, głównie dotyczyły płuc (198 na 372 wykrytych mutacji), macicy (41 na 372 wykrytych mutacji) oraz wątroby (17 na 372 wykrytych mutacji) (146). Wśród wykrytych mutacji przeważały substytucje - 303 z wykrytych 339 mutacji, ponadto 26 małych delecji oraz 10 małych insercji (146).

Badania, wykonane w ramach innych programów badawczych, potwierdziły ustalenia programu TCGA. Mutacje nabycia funkcji NRF2 oraz utraty funkcji KEAP1 i CUL3 były często spotykane w komórkach nowotworowych płuc (147). Ustalono również, że w genie *KEAP1* najczęstszą zmianą jest transwersja cytozyny do

adeniny (147; 148). Natomiast w *NFE2L2* najczęstszym miejscem mutacji jest R34, zlokalizowane w domenie Neh2 (149).

Nieco inne wyniki otrzymano w badaniach w raku wątrobowokomórkowym (HCC). Mutacje w genie *NFE2L2* wykrywane były w bardzo nielicznych przypadkach w odróżnieniu od mutacji w *KEAP1*, które w większości skutkowały utartą kontroli *KEAP1* nad *NRF2* (149). Wiadomo, że do znaczących czynników ryzyka rozwoju HCC należą infekcję wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV), przewlekłe zapalenie wątroby, oraz częste narażenie na toksyny np. alkohol (150). Ponadto w komórkach nowotworowych wątroby z mutacją *KEAP1* oraz nadmierną aktywnością *NRF2* wykryto zwiększone ilości białka szoku termicznego 90 (151). Są doniesienia o wykrytej mutacji *KEAP1* w części N-terminalnej *KEAP1* w nowotworach piersi z mutacją *BRCA*, które mogą być odpowiedzialne za brak aktywności białka i nadmierną aktywność *NRF2* (140).

1.4.3 Działanie *NRF2* w czasie chemioterapii.

Wiele badań dowodzi, że nadmierna aktywność *NRF2* w komórkach nowotworowych odgrywa istotną rolę pod czas terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem tradycyjnych sposobów chemio i radioterapii, np. ciplatyną lub karboplatyną, prowadząc do oporności komórek na stosowany lek (152; 153). Wynika to z mechanizmu molekularnego działania *NRF2*, do genów docelowych którego należą, między innymi, geny białek zaangażowane w uodpornienie komórek. Są to między innymi rodziny receptorów *MRP(1-4)* oraz *ABCG2*, których zwiększona ekspresja skutkuje odpornością na wiele leków używanych do leczenia nowotworów (152). Szereg dowodów otrzymano w badaniach na nowotworowych liniach komórkowych. Obniżenie aktywności *NRF2* w liniach komórkowych raka trzustki oraz płuc powodowało prawidłową odpowiedź tych komórek na leczenie promieniowaniem gamma (154). W liniach komórkowych raka jajnika A2780, wrażliwych na doxorubicin, wykryto zmniejszoną aktywność *NRF2* (154; 155), natomiast akumulacja białka *CUL3* w komórkach raka piersi z mutacją *BRCA* skutkowała zmniejszoną ilością *NRF2* oraz większą wrażliwością komórek na leczenie (155).

Dotychczasowa wiedza nie pozwala na wprowadzenie w praktykę kliniczną terapii, wykorzystujących stymulowanie lub hamowanie działania *NRF2*. Pomimo to trwają intensywne badania nad opracowaniem takiej terapii. Jedno z badań na liniach komórkowych dotyczyło wykorzystania cisplatin, połączonej z podawaniem dużych dawek metforminy. Odkryto, że taka kombinacja dwóch leków znacząco hamuje działania *NRF2* i zwiększa szansę wkroczenia komórek niedrobnokomórkowego raka płuca na drogę apoptozy (156). Znanych jest również kilka leków, hamujących aktywność *NRF2*. Jednym z nich jest brusatol (157; 158; 159). Mimo stosunkowo małego powinowactwa do *NRF2* lek ten hamuje translację wielu białek, w tym białka *NRF2* (160). Podobne wykazuje luteolina (161; 162). Dla lepszego działania próbowano podawać luteolinę wraz z kwasem askorbinowym u pacjentów z wykrytą mutacją *NFE2L2* w celu zwiększenia ich wrażliwości na

leczenie docelowymi chemioterapeutykami (163). Inne badanie wykazało, że przedłużone podawanie apatinibu kieruje komórki niedrobnokomórkowego raka płuca na drogę apoptozy przy udziale NRF2, zaburzając jego rolę w odpowiedzi antyoksydacyjnej komórki (164).

Badania na liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuca dostarczyły informacji o kilku potencjalnych syntetycznych inhibitorach NRF2, takich jak ML385, IM3829 oraz AEM1 (165; 166; 167). Inne badania udowodniły korzystne działanie inhibitorów NRF2 PHA-767491 (168), trigoneliny (169), halofuginonu (170), kordycepiny (171), chryzyny (172) oraz apigeniny (173) in vitro, ale konieczne są dalsze badania in vivo dla zaakceptowania możliwości ich klinicznego zastosowania.

Co ciekawe, badania na myszach z niedrobnokomórkowym rakiem płuca oraz z mutacjami aktywującymi układ NRF2-KEAP1 znacznie lepiej odpowiadały na leczenie immunoterapią niż myszy bez takich mutacji (174).

Prowadzone są również intensywne poszukiwania docelowych inhibitorów, aktywowanych przez NRF2 enzymów i białek, zasilających proces karcynogenezy lub sprzyjających pojawieniu się oporności komórek nowotworowych na chemio- lub radioterapię. Niektóre z przykładów badanych obecnie potencjalnych leków przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Tabela przedstawienie substancji które hamują białka docelowe NRF2.

Miejsce docelowe inhibicji	Substancja hamująca	Piśmiennictwo
Glutaminaza	CB-839	(175)
Biosynteza seryny	CBR-5884	(176)
Szlak pentozofosforanowy	Piceid	(177)
Biosynteza glutationu	2-AAPA, erastyna, Sulfoksymina butioniny	(178; 179; 180; 181)

II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

NRF2 jest jednym z kluczowych białek, zapewniających ochronę komórek przed skutkami różnych rodzajów stresu komórkowego, przede wszystkim stresu oksydacyjnego. Będąc czynnikiem transkrypcyjnym, NRF2 reguluje ekspresję wielu enzymów i białek, których działanie jest niezbędne dla przywrócenia i zachowania równowagi komórkowej. Z drugiej strony, nadmierna aktywacja NRF2 pozwala komórce na przeżycie w niesprzyjających warunkach. Dotyczy to w dużej mierze komórek nowotworowych, stale narażonych na stres, spowodowany zarówno jej zaburzonymi relacjami z organizmem, jak i stosowanymi terapiami przeciwnowotworowymi. Nadaktywność NRF2 stwierdza się w nowotworach wielu typów i często jest spowodowana pojawieniem się w kodującym białko genie swoistych mutacji, które skutkują wzrostem jego stabilności i akumulacją w komórce. Obecność takich mutacji została stwierdzona w znaczących odsetkach różnych typów nowotworów, w tym niedrobnokomórkowym raku płuca.

Drugą częstą przyczyną aktywacji NRF2 w nowotworach są swoiste mutacje w genie kodującym białko KEAP1, które jest negatywnym regulatorem NRF2. Są to mutacje, zaburzające oddziaływanie KEAP1 z NRF2 i prowadzące do stabilizacji czynnika transkrypcyjnego i jego nadaktywności. Mutacje inaktywujące KEAP1 są często wykrywane w niedrobnokomórkowym raku płuca oraz innych typach nowotworów.

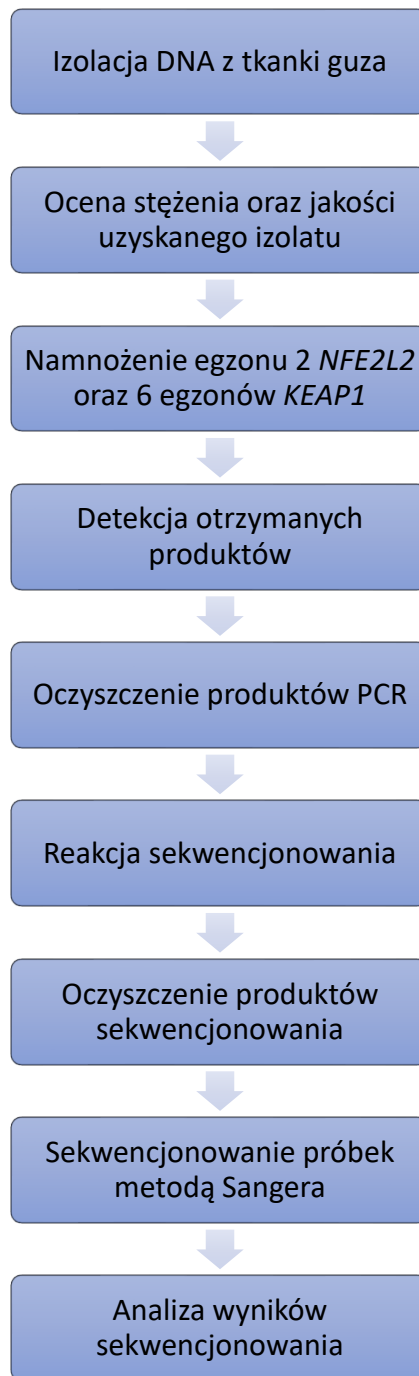
Wiele badań pokazuje jednak, że możliwe są inne drogi aktywacji NRF2 w komórce nowotworowej, a patogenezą molekularną histologicznie podobnych nowotworów może znacząco się różnić w zależności od populacji chorych.

W związku z powyższym, a również biorąc pod uwagę stosunkowo niewielką ilość badań nad mutacjami genów NRF2 i KEAP1 w raku płuca, celem naszej pracy było oszacowanie częstości występowania znanych mutacji aktywujących NRF2 i inaktywujących KEAP1 wśród operacyjnych pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca z regionu północno-wschodniej Polski.

III. MATERIAŁY I METODY

Badaniu poddano 88 guzów niedrobnokomórkowych płuca w stadium zaawansowania I – IIIa pobranych w czasie radykalnej resekcji guza w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. Fragmenty tkanek, przeznaczone do badania molekularnego, zostały natychmiast zamrożone w ciekłym azocie, a następnie przechowywane w temperaturze -80°C. Przed rozpoczęciem badania, tkanki przebadano przez doświadczonego histopatologa w celu potwierdzenia odpowiedniego utkania nowotworowego. Tylko fragmenty, zawierające co najmniej 50% komórek transformowanych zostały użyte do analizy statusu mutacyjnego genów NRF2 i KEAP1.

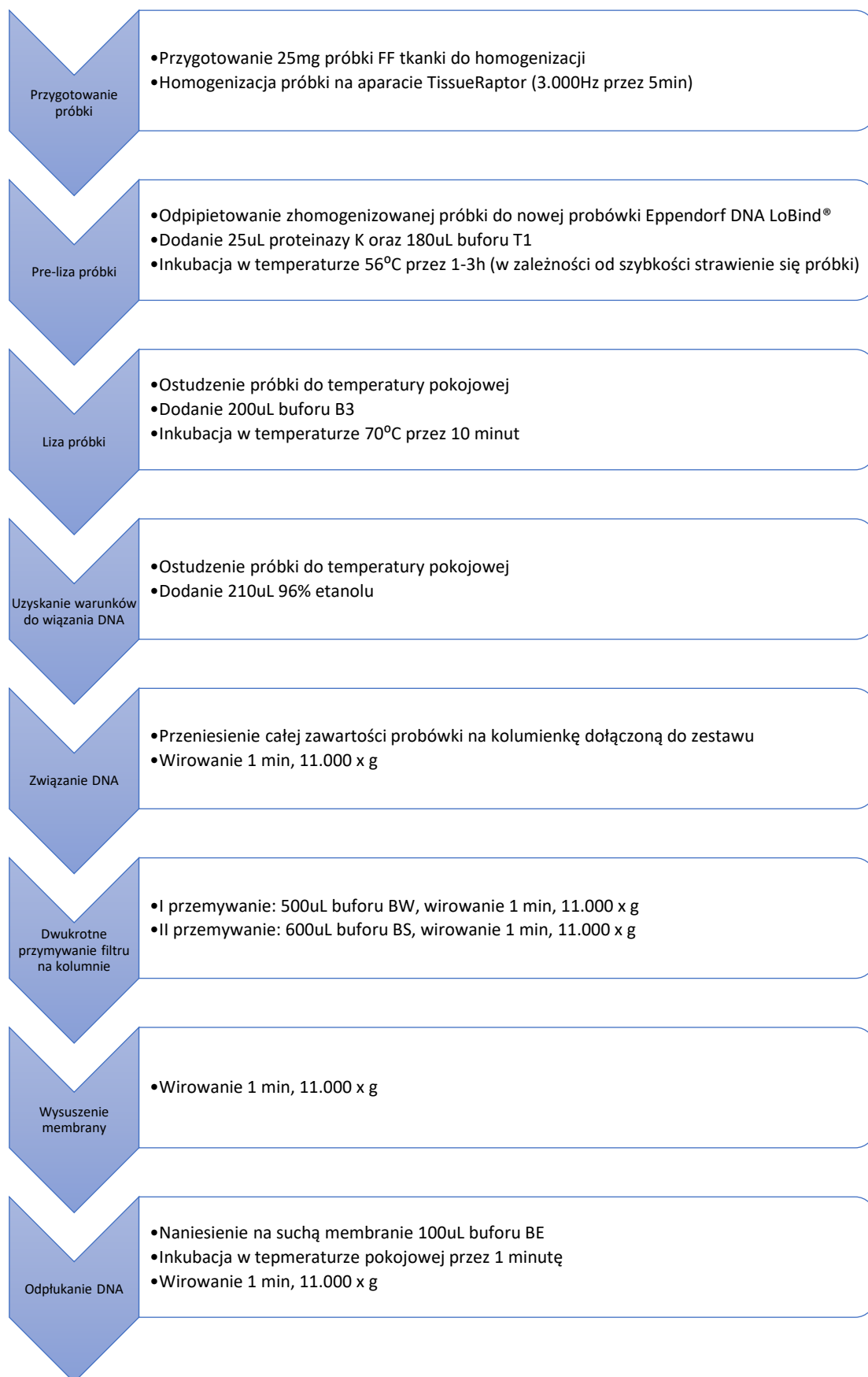
Schemat postępowania z próbkami tkanki guza niedrobnokomórkowego raka płuca prezentuje Rycina 7.



Rycina 7. Schemat metodyki badania.

3.1 Izolacja DNA

Do izolacji DNA z tkanek FF (ang. *fresh frozen*) użyty został gotowy zestaw do izolacji DNA, NucleoSpin® Tissue Column firmy Machery – Nagel. Schemat postępowania przedstawia Rycina 8.



Rycina 8. Procedura postępowania podczas izolacji DNA przy użyciu zestawu NucleoSpin® Tissue Column firmy Machery – Nagel.

Po przeprowadzeniu procedury izolacji otrzymano wysoce oczyszczone DNA. W kolejnym etapie DNA zostało poddane ocenie ilościowej oraz jakościowej. Podczas tej procedury użyto aparatu NanoDrop™ 2000 firmy Thermo Scientific™.

Ocena ilościowa polegała na oznaczeniu spektrofotometrycznym stężenia DNA w każdej próbce, natomiast ocena jakościowa obejmowała analizę stosunku absorbancji przy długości fali 260nm oraz 280nm. Celem pomiaru stosunku absorbancji była ocena stopnia zanieczyszczenia wyizolowanego materiału.

3.2 Namnożenie eksonu 2 *NFE2L2* oraz 6 eksonów *KEAP1*.

Analizie zostały poddane sekwencje nukleotydowe eksonu drugiego genu *NFE2L2* oraz sześciu eksonów genu *KEAP1*. Do namnożenia wszystkich eksonów w reakcji PCR użyte zostały startery reakcji firmy Applied Biosystems™. Staraliśmy dobrać się tak starter reverse i forward aby ich temperatury topnienia były do siebie bardzo zbliżone. Sekwencje starterów przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Startery użyte do namnożenia eksonu 2 *NFE2L2* oraz 6 eksonów *KEAP1*.

Gen	Typ primera	Sekwencja primera	Temperatura topnienia	Długość produktu
<i>NFE2L2</i>	Forward (ekson 2)	TGT TGC TGC TAC TTG ATC CTT ACA G	62°C	541 bp
	Reverse (ekson 2)	TGA TTG ACA TAC TTT GGA GGG AAG A	64°C	
<i>KEAP1</i>	Forward (ekson 2 część 1)	TTG GTG AAC ATG GCC TTG AAG ACA	68°C	505bp
	Reverse (ekson 2 część 1)	TGC TTC ACC TAC TTT GCA GGA A	62°C	
	Forward (ekson 2 część 2)	TCC AGT TTC CTG CCT TGA CAT CTC	66°C	510bp
	Reverse (ekson 2 część 2)	GAC GTC ACA CTG CAG GTC AAG TA	63°C	
	Forward (ekson 3 część 1)	CGC CCA CGG CGT ACA AC	65°C	537bp
	Reverse (ekson 3 część 1)	GTG ACT GGA GAG TCA GCC CGT	64°C	

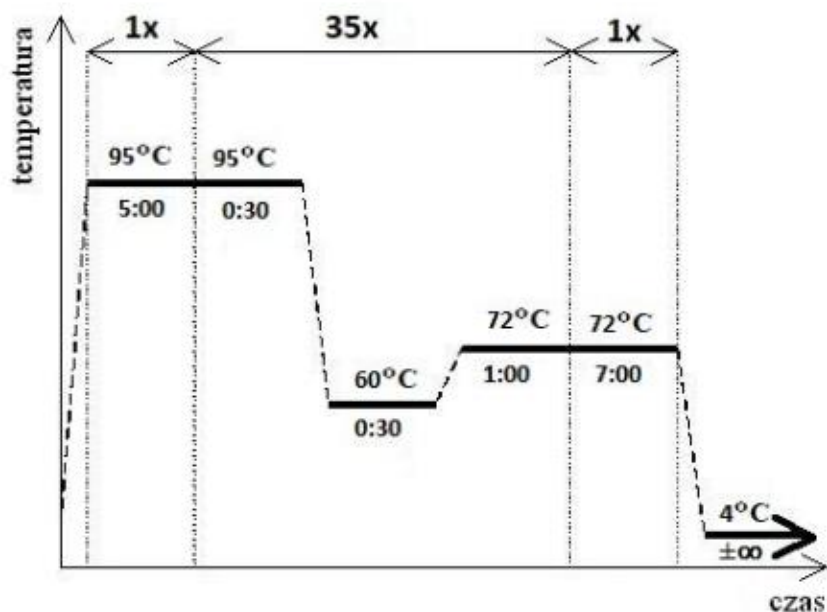
Forward (ekson 3 część 2)	AAG AGG AAA CAG CCT CAG GAA GAA T	64°C	508bp
Reverse (ekson 3 część 2)	GAG GAG CTC ACC CTG CAC AAG	65°C	
Forward (ekson 4)	AGA ATC CAG GGC TTC TGT GGT TA	63°C	407bp
Reverse (ekson 4)	TGG CCC TTA AGT ATT CCA CGA A	63°C	
Forward (ekson 5)	AAG CAA AAG CAA AAG CAG TCC ACA A	67°C	496bp
Reverse (ekson 5)	CCC AGG AAC ACC CCC TAC CAT C	68°C	
Forward (ekson 6 część 1)	AGG CTG TCT TGG ACA CTC CCG	66°C	471bp
Reverse (ekson 6 część 1)	GCA TCT CAC AGC TGC ATC TCT CT	63°C	
Forward (ekson 6 część 2)	AGA GGA GTG TGT TTC AGA AGA AGA G	60°C	510bp
Reverse (ekson 6 część 2)	CAC TGC AAA TAA CCC ATC TTC CG	65°C	

Do przeprowadzenia wszystkich reakcji amplifikacji użyto polimerazę Taq oraz mieszaninę nukleotydów firmy EURx®. Reakcję przeprowadzono w objętości końcowej 10uL. Skład reakcji przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR.

Substancja	Stężenie	Ilość (uL)
DNA	Ok. 10ng/uL	1
Primer forward	10μM	0,5
Primer reverse	10μM	0,5
Polimeraza Taq	5U/uL	0,2
Bufor	10x	1
dNTP	200μM	0,4
Woda	-	6,4

Wszystkie reakcje namnażania wybranych fragmentów *NFE2L2* oraz *KEAP1* zostały przeprowadzone w termocyklerze Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler firmy Applied Biosystems™. Profil termiczny reakcji został optymalnie dopasowany do zastosowanych starterów w reakcjach i przedstawiony na Rycinie 9.

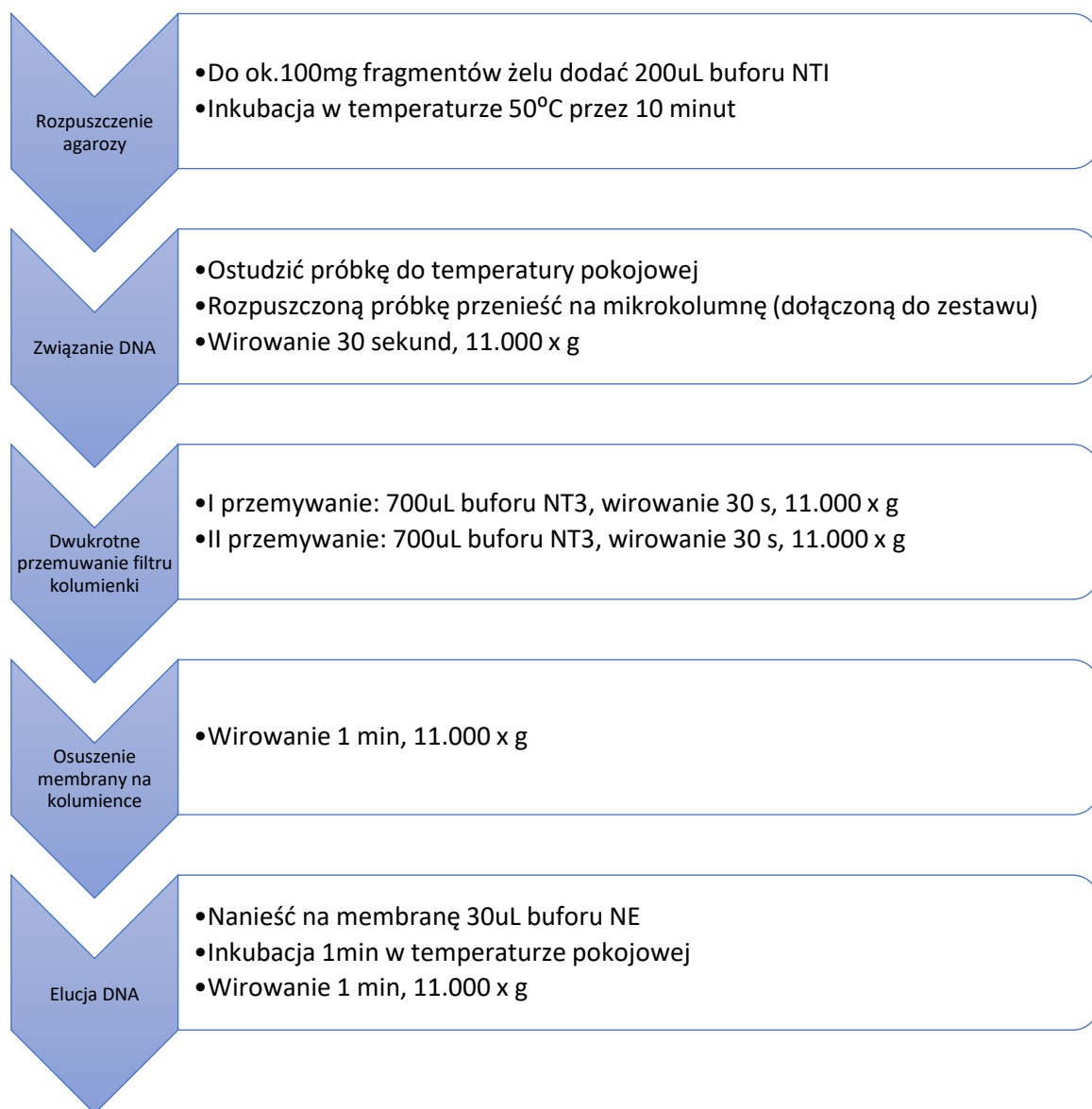


Rycina 9. Profil termiczny zastosowany w reakcji PCR.

3.3 Wykrywanie uzyskanych produktów PCR oraz ich oczyszczanie.

Produkty reakcji PCR zostały wykrywane metodą elektroforezy na 1,5% żelu agarozowym. Zabarwienie cząsteczek DNA uzyskano poprzez dodatek bromku etydyny przed wylaniem żelu do formy. Do każdej elektroforezy w jednej studzience umieszczany był marker mas molekularnych – DNA marker 1 firmy A&A Biotechnology™, dzięki któremu możliwa była identyfikacja wielkości uzyskanych produktów (marker posiada zakres od 100 do 1000 par zasad) i wykluczenie innych produktów np. dimerów starterów. Ponadto oceniana była również intensywność wybarwienia prążka na żelu, dzięki czemu można było stwierdzić, czy uzyskana ilość produktu PCR jest wystarczająca do kolejnych etapów analizy. W przypadku słabo wybarwionych prążków reakcja PCR dla wybranego fragmentu była powtarzana.

Po akceptacji mocno wybarwionych prążków były one ostrożnie wycinane skalpelem z żelu i przenoszone do pojedynczych probówek. W kolejnym etapie znajdujące się w wyciętych prążkach cząsteczki DNA produktów amplifikacji były oczyszczane z agarozy za pomocą zestawu odczynników NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up firmy Machery – Nagel. Schemat postępowania w czasie oczyszczania produktów PCR przedstawia Rycina 10.



Rycina 10. Procedura postępowania podczas oczyszczania produktów PCR z agarozy za pomocą NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up firmy Machery – Nagel.

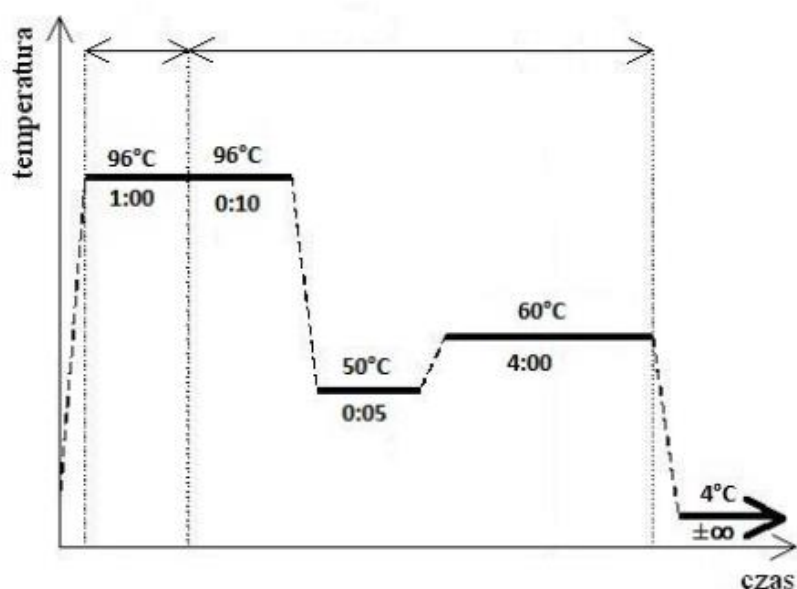
3.4 Reakcja sekwencjonowania.

W kolejnym etapie oczyszczone DNA wykorzystywane było do reakcji sekwencjonowania. Każda próbka była sekwencjonowana dwukierunkowo w celu uniknięcia przypadkowych błędów. Reakcje przeprowadzone były w termocyklerze Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler firmy Applied Biosystems™. Do reakcji wykorzystano najnowszą wersję zestawu BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit firmy Applied Biosystems, co skutkowało większą wydajnością i dokładnością analizy. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji sekwencjonowania przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Skład mieszaniny użytej do reakcji sekwencjonowania.

Substancja	Ilość (uL)
Mieszanka BigDye™ Terminator v3.1	0,2
Bufor do rozcieńczenia BigDye™	0,1
Primer reverse lub forward	0,16
Oczyszczone DNA	3
Woda	6,54

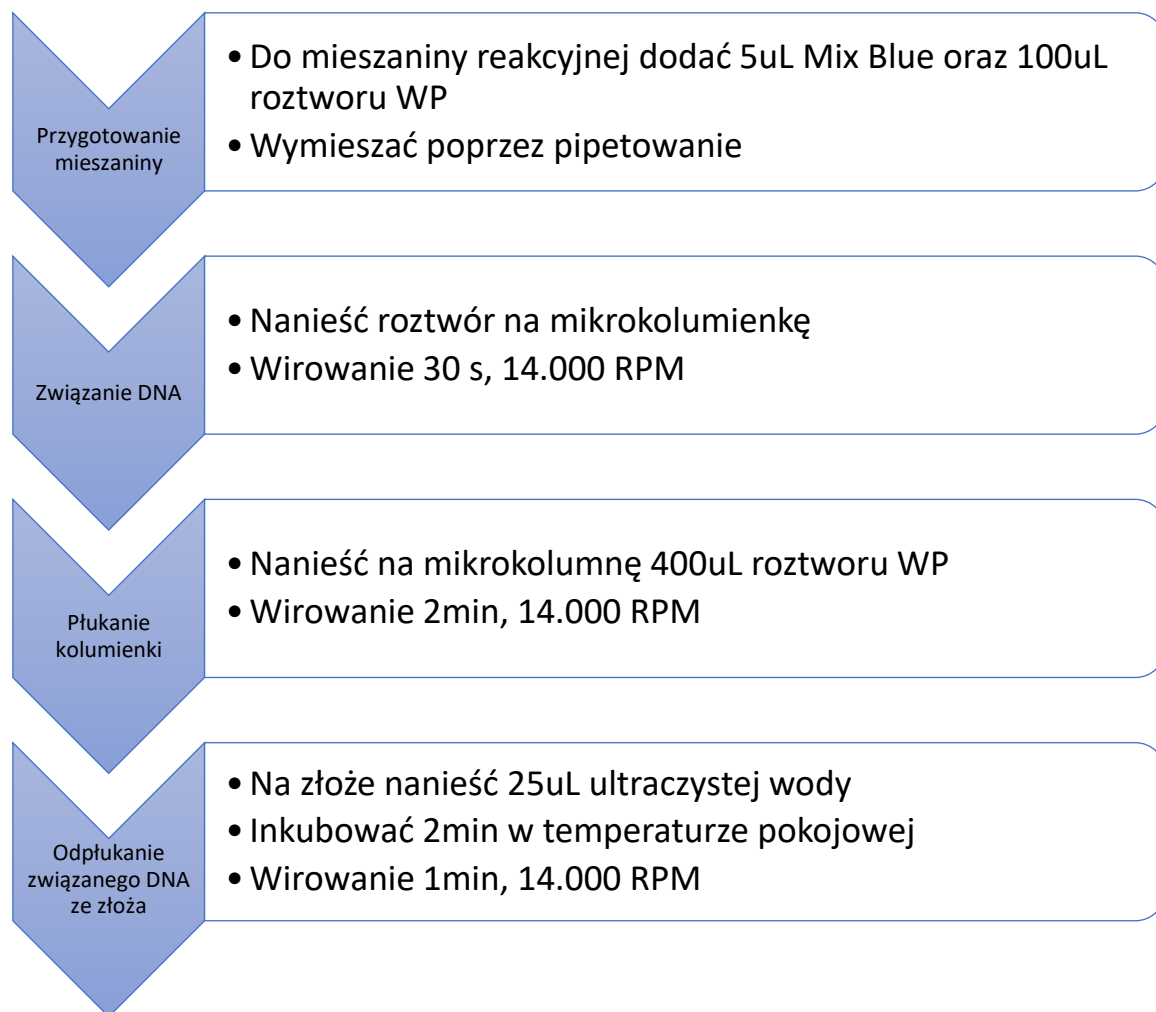
W reakcji sekwencjonowania zastosowano profil termiczny, zaproponowany przez producenta odczynników - firmę Applied Biosystems™. Profil termiczny reakcji przedstawiono na Rycinie 11.



Rycina 11. Profil termiczny reakcji sekwencjonowania.

3.5 Oczyszczanie produktów reakcji sekwencyjnego PCR.

Po reakcji sekwencjonowania każda próbka została poddana oczyszczeniu z niewykorzystanych terminatorów reakcji, które mogłyby w dalszym etapie zaburzyć wyniki sekwencjonowania. Oczyszczanie przeprowadzono przy użyciu zestawu odczynników ExTerminator firmy A&A Biotechnology™. Schemat przeprowadzenia reakcji usuwania niezwiązanych terminatorów reakcji sekwencjonowania przedstawia Rycina 12.



Rycina 12. Procedura postępowania podczas usuwania terminatorów reakcji przy użyciu zestawu Ex Terminator firmy A&A Biotechnology™.

3.6 Sekwencjonowanie

Po usunięciu terminatorów po reakcji sekwencjonowania, próbki DNA zostały poddane elektroforezie sekwencyjnej na sekwenatorze kapilarnym 3500 Genetic Analyzer firmy Applied Biosystems.

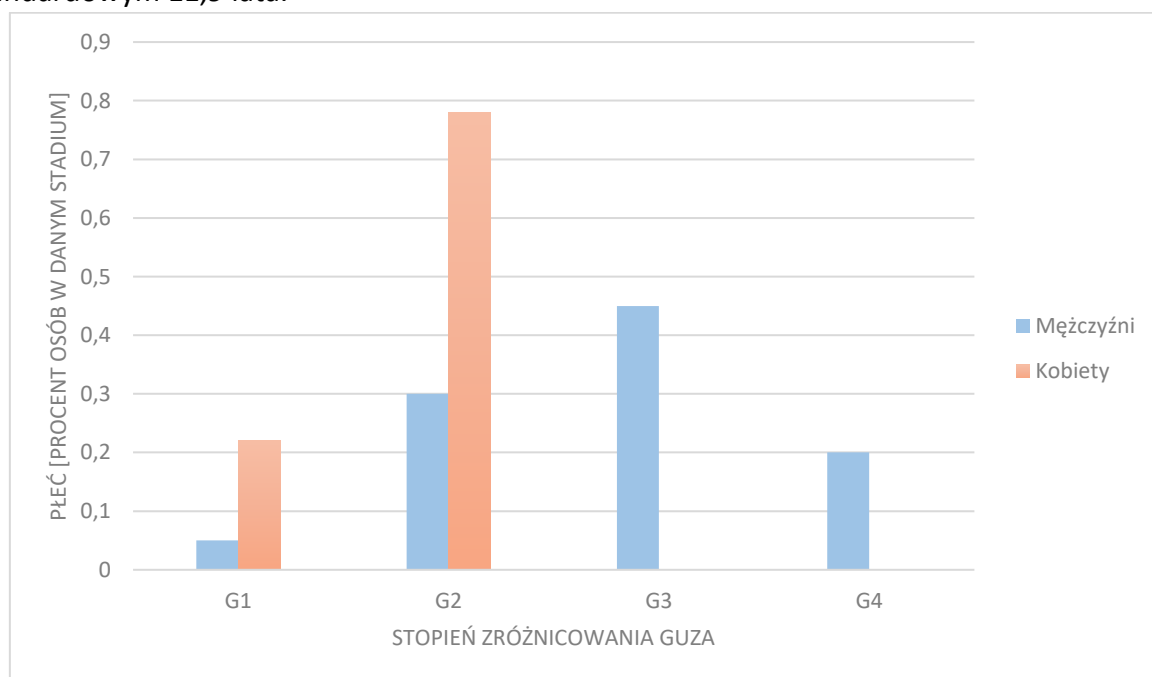
Uzyskane wyniki zostały następnie opracowane przy użyciu programu komputerowego FinchTV. Szczególną uwagę zwracano na odpowiedni rozdział pików oraz ich wysokość. Uzyskane sekwencje porównywane były z sekwencjami referencyjnymi dla genów *NFE2L2* oraz *KEAP1* które są dostępne w bazie „Nucleotides” NCBI (USA) przy użyciu narzędzia bioinformatycznego BLAST, udostępnianego również przez NCBI. Wykryte różnice w sekwencji nukleotydów były w dalszym etapie analizowane pod względem opisanego dla genu polimorfizmu lub ewentualnego wariantu patogennego. Potwierdzenie patogenności wariantu oraz jego udziału w zaburzeniu funkcjonowania układu białek NRF2-KEAP1 w komórkach nowotworowych odbywało się przy użyciu baz danych ClinVar (USA) oraz Catalog of Somatic Mutations in Cancer – COSMIC

(Wielka Brytania). Polegało ono na sprawdzaniu obecności danego wariantu sekwencyjnego w tych bazach i znajdowaniu informacji o skutkach fenotypowych jego obecności w komórce.

IV. WYNIKI

Do analizy wariantów sekwencyjnych genów *NRF2* oraz *KEAP1* zakwalifikowano 88 pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem płuca. Wszyscy pacjenci przeszli operację radykalnej resekcji guza. Grupa badawcza składała się z chorych ze wszystkimi głównymi typami histologicznymi raka: rakiem gruczołowym, wielkokomórkowym oraz płaskonabłonkowym. Ocena histopatologiczna resekowanych guzów wykazała natomiast ich zróżnicowany stopień dojrzałości - od raków dobrze zróżnicowanych (G1 i G2), które charakteryzowały się niską złośliwością, do raków słabo lub niezróżnicowanych słabo zróżnicowanym o wysokim stopniu złośliwości (G3 i G4). Rozkład guzów pod względem stopnia zróżnicowania przedstawia Rycina 13. Ponadto, wszyscy badani mieli określony stopień zaawansowania choroby nowotworowej w skali TNM. 27% badanych stanowili chorzy ze stopniem zaawansowania 1, u 41% badanych stwierdzono stopień zaawansowania 2, natomiast stopień 3 - u 32% badanych.

W grupie badanej przeważali mężczyźni – 72 osoby. Najmłodszy mężczyzna poddany operacji miał 46 lat a najstarszy 81 lat. Średni wiek mężczyzn wynosił 63 lata, odchylenie standardowe wyniosło 7,3 lata. Wśród kobiet najmłodsza miała 48 lat a najstarsza 78 lat. Średni wiek kobiet wyniósł 65 lat z odchyleniem standardowym 11,9 lata.

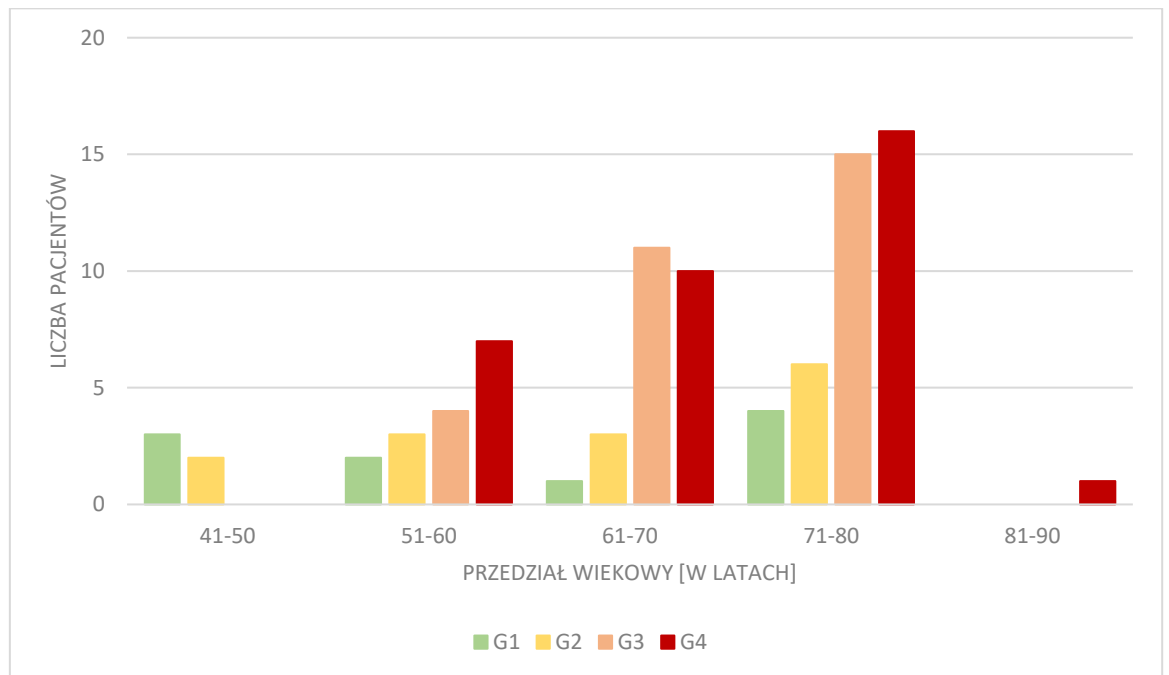


Rycina 13. Wykres przedstawiający ilość pacjentów, z wyodrębnieniem płci, w zależności od stopnia zróżnicowania guza.

U przebadanych kobiet wykryto jedynie guzy dobrze zróżnicowane z niską złośliwością. U mężczyzn dominowały, natomiast, nowotwory o wysokim stopniu

złośliwości - G3 (Rycina 13). Jedynie 8 z 88 przebadanych pacjentów deklarowało niepalenie tytoniu.

Zdecydowaną większość pacjentów stanowiły osoby w przedziałach 61-70 i 71-80 lat, a wykryte u nich guzy płuca charakteryzowały większym stopniem dojrzałości guza. (Rycina 14)



Rycina 14. Wykres przedstawiający zestawienie przedziałów wiekowych pod względem stopnia zróżnicowania guza.

Na podstawie dostępnych w piśmiennictwie światowym danych, dotyczących znanych mutacji, aktywujących NRF2 w komórkach nowotworowych, w niniejszym badaniu sekwencjonowaniu poddany został ekson 2 *NFE2L2* oraz wszystkie 5 eksonów genu *KEAP1*. Poszukiwane były zarówno substytucję pojedynczego nukleotydu jak i delecje oraz insercje zmieniające ramkę odczytu transkryptów genów. Każda wykryta zmiana sekwencyjna (wariant sekwencji potocznie nazywany mutacją) była porównywana z sekwencją referencyjną danego genu w bazie NCBI. Ponadto wykryte warianty genetyczne były sprawdzane pod względem ich wpływu na fenotyp.

Po przeprowadzeniu wszystkich analiz wykryto 9 wariantów genetycznych o potwierdzonej patogenności i udziale w procesie nowotworzenia. Dwa z nich wykryto w genie *NRF2*, natomiast pozostałe siedem – w genie *KEAP1*. Zdecydowaną większość wariantów stanowiły substytucję pojedynczego nukleotydu, a w jednym z guzów wykryto przesuwającą ramkę odczytu delecję nukleotydu. Osiem z dziewięciu wykrytych mutacje w bazie COSMIC zostały oznaczone jako zmiany z wysokim współczynnikiem patogenności na poziomie

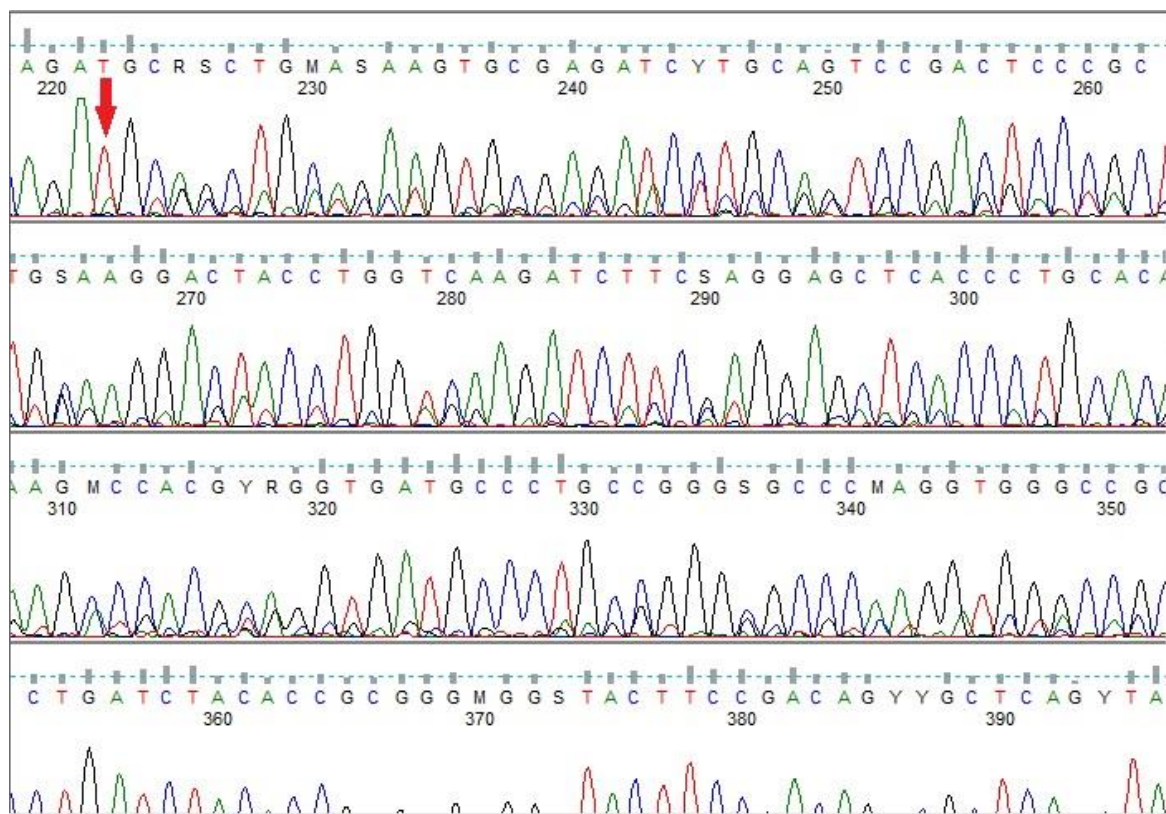
>95% lub >99%. Patogenność jednego z wykrytych wariantów nie została jeszcze ostatecznie potwierdzona.

W genie *KEAP1* 5 z 7 patogennych wariantów sekwencji typu substytucji nukleotydów wykryto w eksonie 2, a 1 substytucja - w eksonie 5. Delecję, natomiast, stwierdzono w eksonie trzecim.

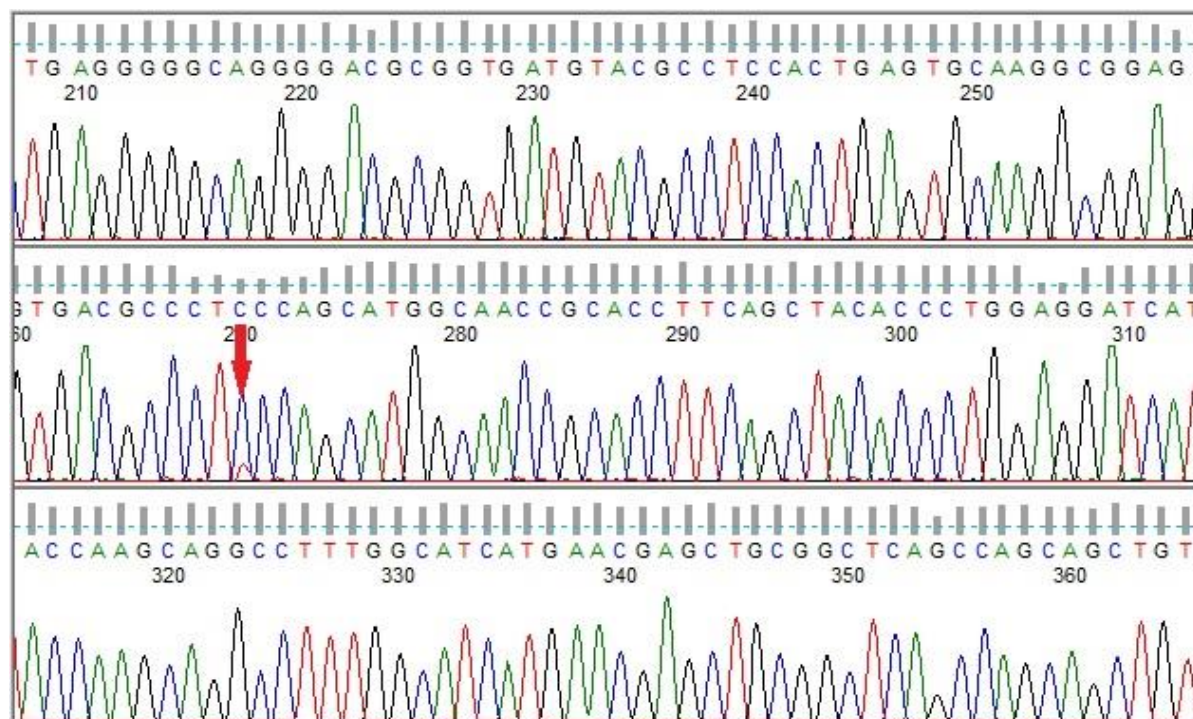
Szczegółowa charakterystyka patogennych wariantów sekwencji, wykrytych w niedrobnokomórkowych guzach przebadanych chorych przedstawiono w Tabeli 6, a sekwencje wariantów – na Rycinach 15 – 23.

Tabela 6. Zestawienie wykrytych wariantów sekwencyjnych wśród 88 pacjentów z NSCLC.

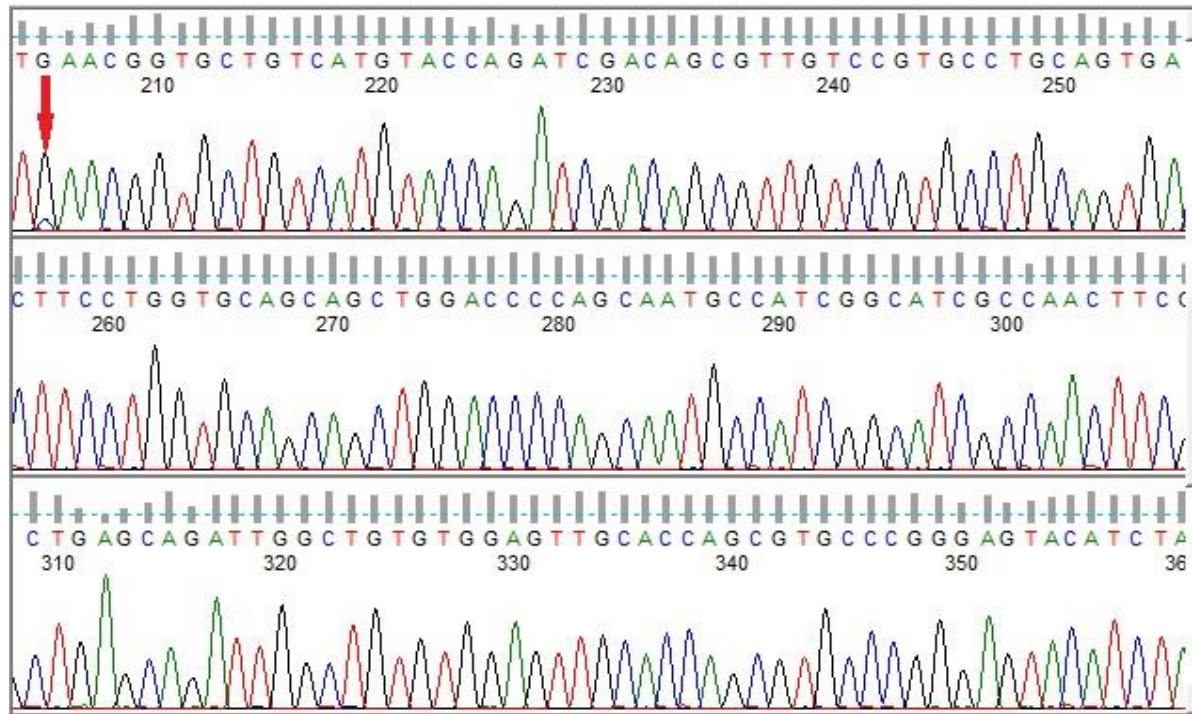
Nazwa genu	Numer pacjenta	Numer eksonu	Wariant genetyczny	Zmiana sekwencji aminokwasowej	Typ mutacji	Status mutacji	Numer referencyjny w bazie COSMIC
KEAP1	123	3	c.860delA	-	Delecja	Nieznany	-
	201	2	c.134 C>T	p.S45F	Substytucja zmiany sensu	Patogenna	COSM4073873
	221	2	c.571 G>C	p.A191P	Substytucja zmiany sensu	Patogenna	COSM6980450
	389	5	c.283 G>A	p.A95T	Substytucja zmiany sensu	Patogenna	COSM990608
	408	2	c.283 G>A	p.A95T	Substytucja zmiany sensu	Patogenna	COSM990608
	492	2	c.271 G>A	p.A91T	Substytucja zmiany sensu	Patogenna	COSM2812647
	504	2	c.404 G>T	p.R135L	Substytucja zmiany sensu	Patogenna	COSM2812643
NFE2L2	154	2	c.88 C>T	p.L30F	Substytucja zmiany sensu	Patogenna	COSM132854
	196	2	c.235 G>C	p.E79Q	Substytucja zmiany sensu	Patogenna	COSM120958



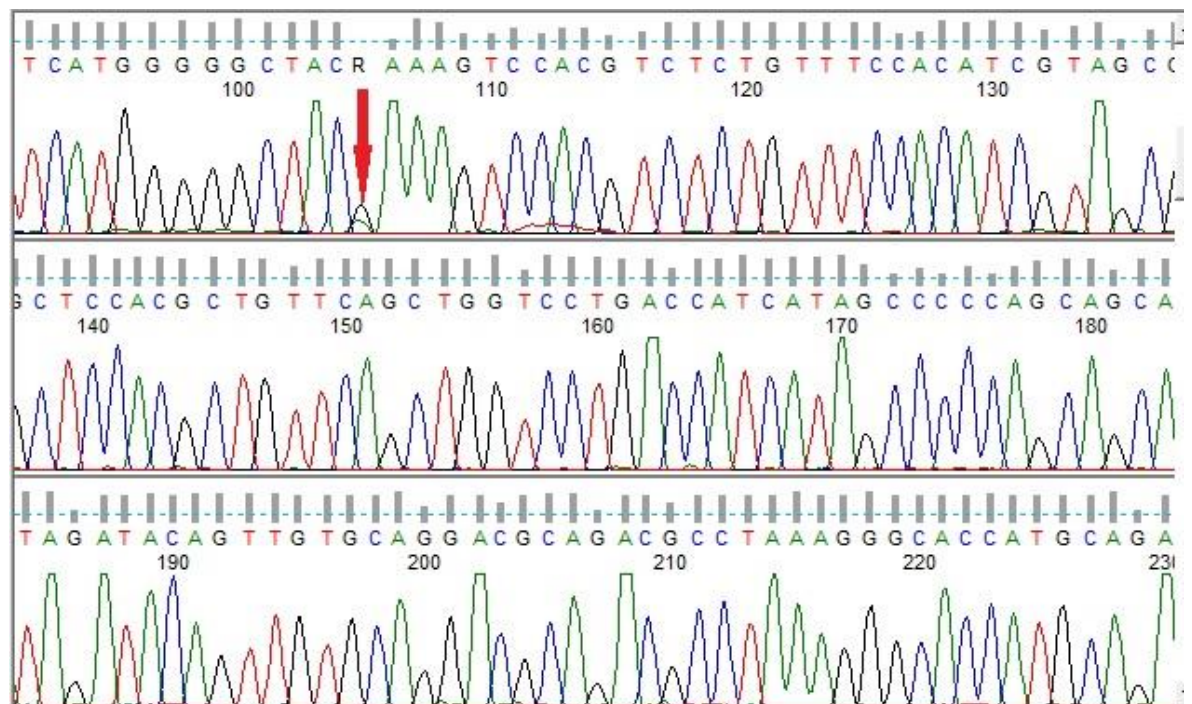
Rycina 15. Wynik sekwencjonowania KEAP1 u pacjenta 123.



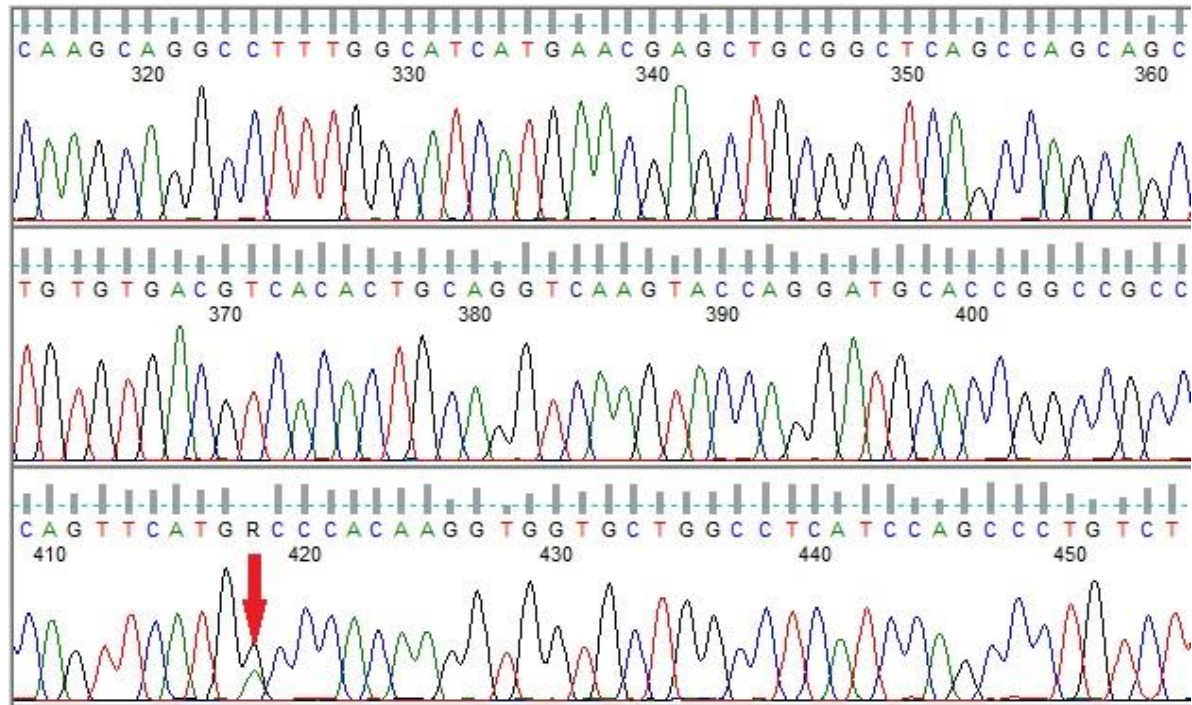
Rycina 16. Wynik sekwencjonowania KEAP1 u pacjenta 201.



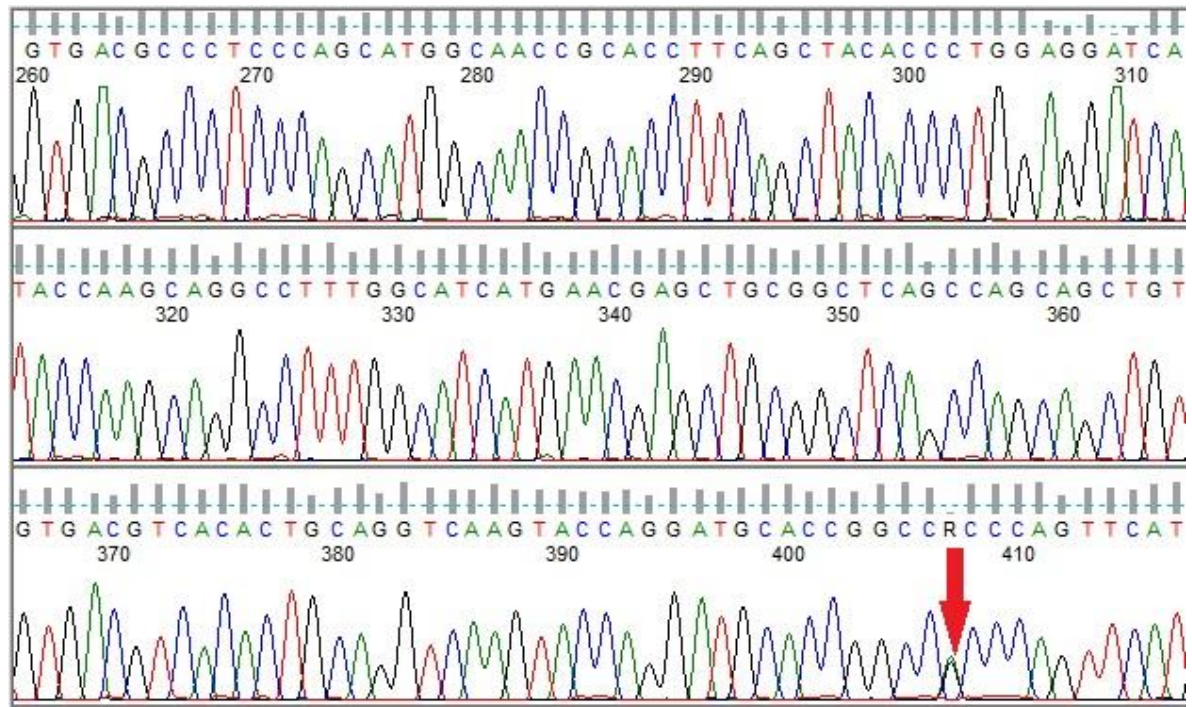
Rycina 17. Wynik sekwencjonowania KEAP1 u pacjenta 221.



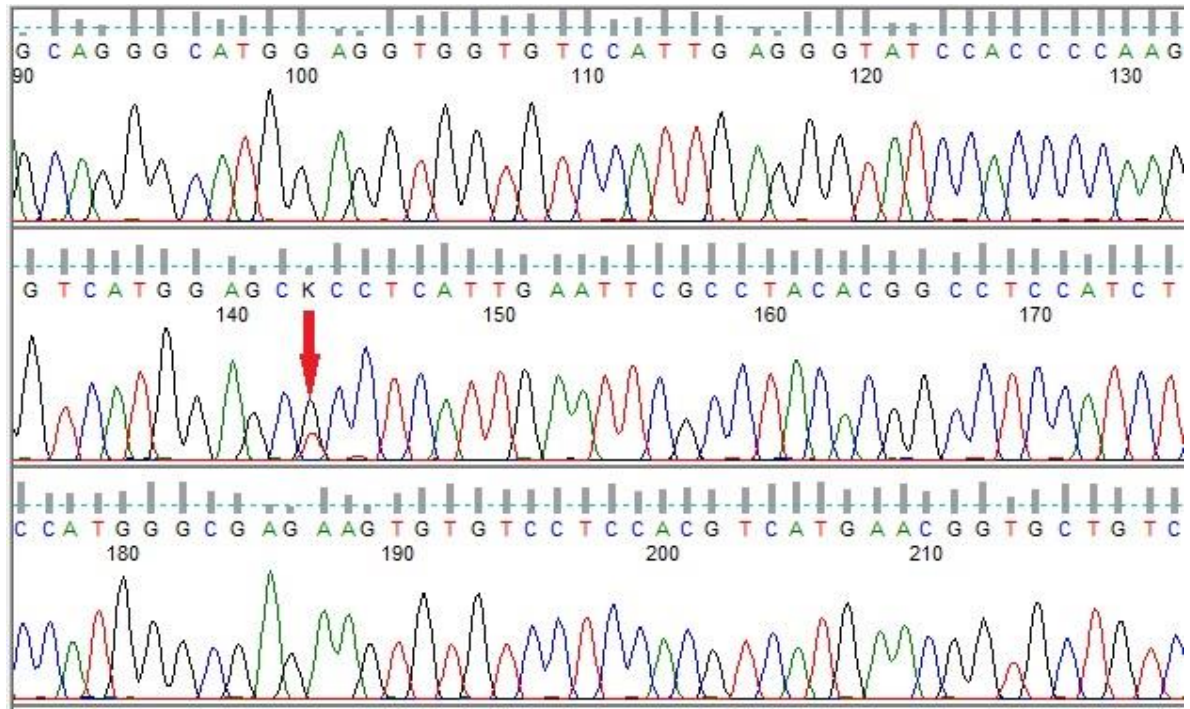
Rycina 18. Wynik sekwencjonowania KEAP1 u pacjenta 389.



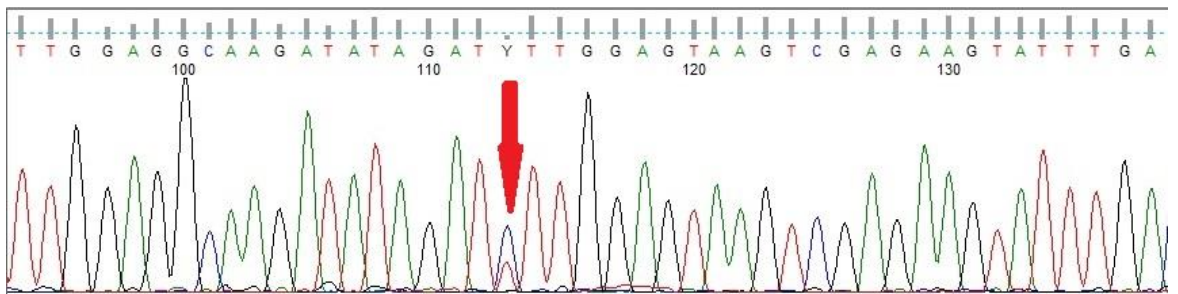
Rycina 19. Wynik sekwencjonowania KEAP1 u pacjenta 408.



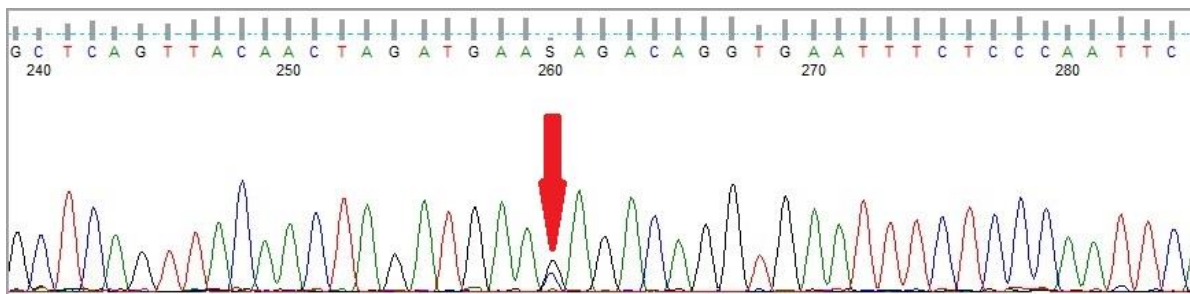
Rycina 20. Wynik sekwencjonowania KEAP1 u pacjenta 492.



Rycina 21. Wynik sekwencjonowania KEAP1 u pacjenta 504.



Rycina 22. Wynik sekwencjonowania NFE2L2 u pacjenta 154.



Rycina 23. Wynik sekwencjonowania NFE2L2 u pacjenta 196.

V. DYSKUSJA

W dzisiejszych czasach rak płuca jest jednym z najczęściej wykrywanych nowotworów na świecie (3). Zdecydowany prym wśród raka płuca stanowi rak niedrobnokomórkowy, wykrywany w 80% nowych przypadków tego nowotworu. Poprzez wpływ wielu czynników etiologicznych na rozwój nowotworów, nawet należące do tego samego typu i podtypu histopatologicznego guzy bardzo często charakteryzują się odmiennymi profilami molekularnymi, co skutkuje różnym rokowaniem oraz trudnościami w wyborze najskuteczniejszej metody leczenia. Poza tym, wprowadzenie obecnie nowoczesnych metod terapii celowanej nowotworów opiera się na profilach molekularnych zmian genetycznych w komórkach transformowanych. W związku z powyższym, koniecznym staje się ocena profili mutacyjnych w guzach.

Według danych piśmiennictwa światowego jednym z najczęściej wykrywanych zaburzeń w niedrobnokomórkowym raku płuca jest niekontrolowana aktywacja czynnika transkrypcyjnego NRF2, która umożliwia przeżycie komórek nowotworowych w skrajnie niekorzystnych warunkach, w tym podczas chemio- i radioterapii. Wśród wielu opisanych mechanizmów molekularnych aktywacji NRF2 w rakach płuca stosunkowo często wykrywane są swoiste mutacje w kodującym NRF2 genie oraz genie białka KEAP1, które jest głównym negatywnym regulatorem NRF2. Są to mutacje, które zaburzają oddziaływanie pomiędzy NRF2 i KEAP1 i skutkują stabilizacją i, odpowiednio, zwiększoną aktywnością pierwszego. Mimo że występowanie mutacje aktywujące NRF2 i inaktywujące KEAP1 w niedrobnokomórkowym raku płuca są uznawane za powszechne, częstość ich występowania, określona w poszczególnych badaniach waha się dość znacząco (od 10 do 30%). W związku z powyższym celem niniejszej pracy była ocena występowania znanych mutacji, aktywujących białko NRF2 w niedrobnokomórkowych rakach płuca pacjentów z regionu Północno-Wschodniej Polski.

Na podstawie danych piśmiennictwa, w badaniu analizowano sekwencje eksonu drugiego genu NRF2 oraz wszystkich eksonów kodujących genu KEAP1, a do oceny patogenności wykrytych wariantów sekwencyjnych wykorzystano dwie światowe bazy danych – ClinVar i COSMIC. Grupa badawcza składała się z 88 osób z rozpoznaniem rakiem nie drobnokomórkowym płuca, wśród których wykryto 9 patogennych wariantów sekwencyjnych (mutacji) w badanych genach. Siedem z nich z nich wykryto w genie *KEAP1*, natomiast pozostałe 2 – w kodującym NRF2 genie *NFE2L2*. Częstość występowania mutacji w *KEAP1* w guzach badanych pacjentów wyniosła 8%, a w *NFE2L2* - 2,3%. Ogólna częstość występowania aktywujących NRF2 mutacji w naszym badaniu wyniosła nieco powyżej 10%. Wśród wykrytych zmian znajdowała się 1 delecja pojedynczego nukleotydu, skutkująca przesunięciem ramki odczytu transkryptu. Natomiast większość wykrytych zmian (8 z 9) stanowiły substytucje pojedynczego nukleotydu, wszystkie o charakterze zmiany sensu. Analiza skutków fenotypowych wykrytych mutacji nie była celem niniejszej pracy, ale na podstawie zgromadzonych w bazach COOSMIC i ClinVar danych można stwierdzić, że mutacje te uniemożliwiają oddziaływanie pomiędzy

białkami NRF2 i KEAP1, tym samym zaburzają prawidłowy proces negatywnej regulacji NRF2.

Obecnie, w bazie COSMIC zostało opisanych 691 wykrytych w genie *NFE2L2* wariantów sekwencji(185), natomiast w odniesieniu do genu *KEAP1* liczba ta wynosi 1 044 wariantów (186). Wśród opisanych zmian w obu genach dominują substytucje typu zmiany sensu (71,76% oraz 68,69%, odpowiednio) (185, 186). Mimo to, patogenny charakter oraz udział w procesie nowotworzenia udowodniono tylko dla niektórych z nich (185,186). Większość wariantów są opisywane jako warianty o nieznanym znaczeniu klinicznym i oczekują na potwierdzenie lub zaprzeczenie ich patogenności. Dotyczy to również jednej z mutacji, wykrytej w niniejszym badaniu, której wpływ na fenotyp nie został ostatecznie poznany.

Wyniki niemniejszej pracy pokazują stosunkowo niską częstość występowania patogennych mutacji w genach NRF2 k KEAP1 w guzach płuca przebadanych pacjentów. Nieco wyższe wartości zostały opublikowane przez badaczy we wcześniejszych analizach . Są to wartości rzędu 3,5 – 15% dla mutacji w genie *NFE2L2* oraz 12 – 17% w genie *KEAP1* (187). W jednym z badań częstość występowania mutacji w układzie genów *NRF2-KEAP1* określono na 27,9% (188). Należy jednak podkreślić stosunkowo niedużą liczbę przeprowadzonych dotychczas analiz mutacyjnego statusu genów NRF2 i KEAP1 w rakach płuca.

Poza tym, niniejsze badanie obejmowało stosunkowo jednorodną grupę pacjentów. Prawie wszyscy pacjenci byli w stadium zaawansowania klinicznego I lub II, a badane guzy – guzami operacyjnymi. Badanie nie obejmowało przypadków zaawansowanego raka płuca, co mogło mieć wpływ na uzyskane wyniki. Mimo braku danych, dotyczących przypuszczalnego czasu ewentualnej aktywacji NRF2 w procesie nowotworzenia rola fizjologiczna czynnika w komórce sugeruje, że powinna to być raczej zmiana, która następuje stosunkowo późno pod czas ewolucji guza, a może również pojawiać się pod wpływem terapii przeciwnowotworowej jako mechanizm indukowanej odporności.

Największa grupa pacjentów została przebadana w ramach projektu TCGA (ang. The Cancer Genome Atlas), który obejmował nowotwory kilkunastu różnych typów, w tym drobnokomórkowe oraz niedrobnokomórkowe raki płuca. Ogólnie w badaniu wzięło udział ponad 15 000 pacjentów. U 2 700 z nich przeprowadzono analizę sekwencyjną genu *NFE2L2*, a 3 300 - genu *KEAP1*. Wykryto 196 przypadków mutacji w *NFE2L2* oraz 339 przypadków mutacji w *KEAP1*, a częstość występowania mutacji w przebadanych guzach wynosiła 13,07% oraz 12,26%, odpowiednio. Grupa badanych guzów była bardzo zróżnicowana i obejmowała przypadki zarówno raków we wczesnych stadiach rozwoju, jak raków zaawansowanych. Duże zróżnicowanie pod względem płci, rasy, nawyków żywieniowych i innych czynników dotyczyło również objętych projektem pacjentów.

Na wielu przykładach udowodniono, że podłoże molekularne nowotworów może znacząco się różnić w różnych populacjach chorych. Zostało to pokazano również w odniesieniu do mutacji w układzie NRF2-KEAP1, aczkolwiek badania nie są liczne. Tak, w częstość występowania mutacji *KEAP1* w guzach płuca u pacjentów

z populacji północno amerykańskiej oszacowano na 15% (189), a w populacji azjatyckiej - na poziomie 8% (137). Podobnie częstość występowania mutacji w genie *NFE2L2* w jednym z badań, obejmującym 176 guzów niedrobnokomórkowych płuca oraz 20 linii komórkowych, oceniono na 32% (190), natomiast w badaniu 279 guzów od pacjentów z innego obszaru świata wartość ta wyniosła 12% (191). Nie wątpliwie, różnego rodzaju czynniki środowiskowe, w tym zanieczyszczenie środowiska naturalnego, powszechność palenia tytoniu i innych szkodliwych nałogów w populacji, a możliwe i rasa pacjentów może mieć znaczący wpływ na patogenezę nowotworu.

Dodatkowy wpływ na uzyskane wyniki może również mieć zastosowana metodologia badawcza. W niniejszym badaniu do detekcji mutacji w genach zastosowano konwencjonalne sekwencjonowanie DNA według metody terminacji syntezy łańcucha, znanej również jako sekwencjonowanie według Sangera. Technika ta charakteryzuje się stosunkowo wysokim dolnym progiem detekcji wariantów sekwencyjnych, który określony został na 10% zmienionych sekwencji w odniesieniu do sekwencji prawidłowych. Dokładny wybór próbek tkanki guza o wysokim stopniu utkania nowotworowego oraz metody oczyszczania zarówno produktów PCR, jak i produktów reakcji sekwencjonowania, zastosowane w niniejszym badaniu, pozwoliły na zwiększenie czułości analizy. Mimo to, nowoczesne metody sekwencjonowania DNA, w tym czułe i ultraczułe sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) charakteryzują się znacznie wyższą czułością i umożliwiają wykrywanie wariantów sekwencyjnych, które są obecne w bardzo nielicznych komórkach badanej próbki tkanki.

Podsumowując, patogenne mutacje w genach *NFE2L2* oraz *KEAP1*, skutkujące aktywacją czynnika transkrypcyjnego NRF2 i zwiększające zdolność komórek do przeżycia w warunkach skrajnie niesprzyjających, mogą być wykryte występują w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca, aczkolwiek częstość ich występowania szacuje się na około 10%. Częściej mutacje wykrywane są w genie *KEAP1*, niż w genie *NFE2L2*. Częstsze występowanie mutacji wyżej wymienionych genów w opublikowanych w piśmiennictwie światowym badaniach może być częściowo związane z różnicami, dotyczącymi badanych populacji pacjentów, złożonością guzów jak i zastosowaną w badaniach metodologią.

VI. WNIOSKI

1. Wykryto 9 przypadków mutacji patologicznych w genach *NFE2L2* i *KEAP1* w 88 rakach niedrobnokomórkowych płuca, poddanych radykalnej resekcji guza.
2. Częstość występowania mutacji w genie *NFE2L2* w badanej grupie wyniosła 2,3%, a w genie *KEAP1* - 8%.
3. Wśród wykrytych mutacji dominowały substytucje typu zmiany sensu (8 z 9). Wykryto również 1 przypadek delecji 1 nukleotydu, przesuwającej ramkę odczytu transkryptu.
4. Wysoki stopień patogenności wariantu sekwencji potwierdzono dla 8 z 9 wykrytych mutacji, natomiast dla 1 z wariantów patogenność nie została ostatecznie udowodniona.
5. Patogenne warianty sekwencyjne wykryto w trzech z 5 przebadanych eksonów genu *KEAP1*, lecz większość z nich wykryto w eksonie 2.

VII. STRESZCZENIE

Stres komórkowy, powodowany zaburzeniem balansu pomiędzy czynnikami utleniającymi a antyoksydantami, często towarzyszy progresji nowotworu i powstaje jako skutek terapii antynowotworowej. Komórki nowotworowe mają mechanizmy które pozwalają im przetrwać w środowisku permanentnego stresu komórkowego. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NRF2 stanowi kluczową rolę w przetrwaniu komórek w takich warunkach dzięki kontroli ekspresji wielu elementów odpowiedzi antyoksydacyjnej komórki. Kluczowym mechanizmem aktywacji NRF2 są mutacje aktywujące i inaktywujące negatywnego regulatora NRF2 znanego pod nazwą białka KEAP1. Mutacje aktywujące w genie NRF2 – *NFE2L2* oraz inaktywujące mutacje w genie *KEAP1* zostały opisane w wielu typach nowotworów w tym w niedrobnokomórkowym raku płuca (NSCLC), choć ich dokładna częstość występowania nie została jeszcze precyzyjnie określona.

Celem powyższej rozprawy doktorskiej była ocena statusu mutacyjnego genów *NFE2L2* oraz *KEAP1* u chorych na operacyjnego niedrobnokomórkowego raka płuca z regionu północno-wschodniej Polski. Łącznie oceniono 88 próbek niedrobnokomórkowego raka płuca pobranych podczas radykalnej resekcji guza od pacjentów w stadium I – IIIA zaawansowania choroby. Analiza mutacji obejmowała ekson 2 *NFE2L2* oraz eksony 1-5 *KEAP1*. Mutacje były wykrywane metodą konwencjonalnego sekwencjonowania terminacji łańcucha (metodą Sanger) oraz przy użyciu programu bioinformatycznego BLAST. Efekty fenotypowe wykrytych wariantów sekwencyjnych były oceniane na podstawie danych w bazie COSMIC.

Dziewięć mutacji z potwierdzonym patologicznym wpływem na fenotyp oraz udziałem w progresji nowotworowej zostały wykryte w *NFE2L2* oraz *KEAP1*. Częstość występowania mutacji aktywujących wśród badanych pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca wyniosła 10,2%. Większość mutacji (7 z 9) zostało wykrytych w genie *KEAP1*, podczas gdy w *NFE2L2* znaleziono jedynie 2 mutacje. Bazując na danych z bazy COSMIC, ustalono że mutacje te zapobiegały interakcji białka KEAP1 z czynnikiem transkrypcyjnym NRF2, co wywiera negatywny wpływ na regulację aktywności NRF2.

Aktywacja molekularnych mechanizmów pozwalających komórkom nowotworowym przetrwać stres oksydacyjny prawdopodobnie występuje podczas rozwoju niedrobnokomórkowego raka płuca. W niektórych nowotworach aktywność ta jest wyrażona poprzez występowanie mutacji w genach *KEAP1* oraz *NFE2L2* co zakłóca ich interakcję i negatywną regulację NRF2 poprzez KEAP1. W pracy tej, względnie niski odsetek guzów z potwierdzoną mutacją (10,2%) może wiązać się z wczesnymi stadiami zaawansowania choroby nowotworowej wśród badanych pacjentów.

VIII. ABSTRAKT

Cellular stress, caused by the disruption of the balance between oxidative and antioxidant factors, often accompanies the progression of cancer and arises as a result of anti-cancer therapy. Cancer cells have mechanisms that allow them to survive such danger. The activation of the transcription factor NRF2 plays a crucial role in survival as it controls the expression of various cellular antioxidant systems. Key mechanisms of NRF2 activation include activating mutations and inactivation of the negative regulator of NRF2, known as the KEAP1 protein. Activating mutations in the NRF2 gene *NFE2L2* and inactivating mutations in the *KEAP1* gene have been described in various types of cancer, including non-small cell lung cancer (NSCLC), although the exact frequency of their occurrence has not been precisely determined.

The aim of this doctoral dissertation was to assess the mutational status of the *NFE2L2* and *KEAP1* genes in patients with operable non-small cell lung cancer from the northeastern region of Poland. A total of 88 non-small cell lung cancers were examined, collected during radical tumor resection in patients with stage I-IIIa of cancer. Exons 2 of the *NFE2L2* gene and 1-5 of the *KEAP1* gene were subjected to mutational analysis. Mutations were detected using the conventional chain termination sequencing (Sanger method) and the BLAST bioinformatics program. The phenotypic effect of the detected sequence variants was assessed based on data from the COSMIC database.

Nine mutations with confirmed pathological significance and involvement in cancer progression were detected in the *NFE2L2* and *KEAP1* genes. The frequency of activating NRF2 mutations in the operable non-small cell lung tumors of the examined patients was 10.2%. The majority of mutations (7 out of 9) were identified in the *KEAP1* gene, while only 2 mutations were found in the *NFE2L2* gene. Based on the COSMIC database, it was determined that these mutations prevented the interaction of the KEAP1 protein with the NRF2 transcription factor and the proper negative regulation of NRF2 activity.

The activation of molecular mechanisms that allow cancer cells to survive oxidative stress likely occurs during the development of non-small cell lung cancer. In some cancers, this activation occurs through mutations in the *KEAP1* and *NFE2L2* genes, disrupting their interaction and proper negative regulation of NRF2 activity. In this work, the relatively low percentage of tumors with confirmed alterations (10.2%) may be due to the early stages of cancer in the examined patients.

IX. PIŚMIENICTWO

1. [Online] Dostęp na dzień 13.03.2023.
https://mapipedia.com/s/u/dr-dave/average_life_expectancy_by_country_since_1800.html.
2. Krajowy Rejestr Nowotworów. *onkologia.org.pl*. [Online] Dostęp na dzień 13.03.2023.
3. Global Cancer Observatory. *gco.iarc.fr*. [Online] Dostęp na dzień 13.03.2023.
4. J Kutkowska I Porębska , A Rapak. Niedrobnokomórkowy rak płuca – mutacje, celowane i skojarzone terapie. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2017, 71, strony 431-445.
5. [Online] Dostęp na dzień 13.03.2023. <https://europeanlung.org/en/information-hub/lung-conditions/lung-cancer/>.
6. [Online] Dostęp na dzień 13.03.2023. <https://www.cdc.gov/cancer/lung/>.
7. A Matakidou T Eisen, R S Houlston. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *British Journal of Cancer*. 2005, 93, strony 825-833.
8. [Online] Dostęp na dzień 13.03.2023.
<https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/lung-cancer/lung-cancer-types>.
9. [Online] Dostęp na dzień 13.03.2023.
https://www.pkpo.pl/userfiles/LUNGS_2018_06_25_a.pdf.
10. [Online] Dostęp na dzień 13.03.2023. https://www.onkonet.pl/dp_rakpluca3.php.
11. W N Rom J G Hay, T C Lee, Y Jiang, K M Tchou-Wong. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000, 161, strony 1355–1367.
12. E Forgacs S Zöchbauer-Müller, E Oláh, J D Minna. Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. *Pathology and Oncology Research*. 2001, 7, strony 6-13.
13. W A Cooper D C L Lam, S A O'Toole, J D Minna. Molecular biology of lung cancer. 2013, 5, strony 479–490.
14. C Espinosa-Diez V Miguel, D Mennerich, T Kietzmann, P Sánchez-Pérez, S Cadenas, S Lamas. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*. 2015, 6, strony 183-197.
15. [Online] Dostęp na dzień 13.03.2023. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NFE2L2>.

16. G Pizzino N Irrera, M Cucinotta, G Pallio, F Mannino, V Arcoraci, F Squadrito, D Altavilla, A Bitto. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017, 8416763.
17. P Moi K Chan, I Asunis, A Cao, Y W Kan. 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. *91, 1994, 21, strony 9926-9930*.
18. JY Chan XL Han, YW Kan. Cloning of Nrf1, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 1993, 90, strony 11371-11375.
19. A Kobayashi E Ito, T Toki, K Kogame, S Takahashi, K Igarashi, N Hayashi, M Yamamoto. Molecular cloning and functional characterization of a new Cap'n'Collar family transcription factor Nrf3. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274, strony 6443-6452.
20. NC Andrews H Erdjument-Bromage, MB Davidson, P Tempst, SH Orkin. Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature*. 1993, 362, strony 722-728.
21. T Oyake K Itoh, H Motohashi, N Hayashi, H Hoshino, M Nishizawa, M Yamamoto, K Igarashi. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Molecular and Cellular Biology*. 1996, 16, strony 6083-6095.
22. K Itoh T Chiba, S Takahashi, T Ishii, K Igarashi, Y Katoh, T Oyake, N Hayashi, K Satoh, I Hatayama, M Yamamoto, Y Nabeshima. An Nrf2/small maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997, 236, strony 313-322.
23. Y Katoh K Itoh, E Yoshida, M Miyagishi, A Fukamizu, M Yamamoto. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein and synergistically activate transcription. *Genesis Cells*. 2001, 6, strony 857-868.
24. P Nioi T Nguyen, PJ Sherratt, CB Pickett. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology*. 2005, 25, strony 10895-10906.
25. W Li SW Yu, AN Kong. Nrf2 possesses a redox sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, 281, strony 27251-27263.
26. Y Katoh K Iida, MI Kang, A Kobayashi, M Mizukami, KI Tong, M McMahon, JD Hayes, K Itoh, M Yamamoto. Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005, 433, strony 342-350.

27. KI Tong Y Katoh, H Kusunoki, K Itoh, T Tanaka, M Yamamoto. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Molecular and Cellular Biology*. 2006, 26, strony 2887-2900.
28. P Rada Al Rojo, S Chowdhry, M McMahon, JD Hayes, A Cuadrado. SCF/{beta}-TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. 2011, 31, strony 1121-1133.
29. A Rahal A Kumar, V Singh, B Yadav, R Tiwari, S Chakraborty, K Dhama. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*. 2014, 2014, str. 761264.
30. H Suzuki T Chiba, T Suzuki, T Fujita, T Ikenoue, M Omata, K Furuichi, H Shikama, K Tanaka. Homodimer of two F-box proteins betaTrCP1 or betaTrCP2 binds to IkappaBalpha for signal-dependent ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, 275, strony 2877-2884.
31. G Wu G Xu, BA Schulman, PD Jeffrey, JW Harper, NP Pavletich. Structure of a beta-TrCP-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase. *Molecular Cell*. 2003, 11, strony 1445-1456.
32. H Wang K Liu, M Geng, P Gao, X Wu, Y Hai, Y Li, Y Li, L Luo, JD Hayes, XJ Wang, X Tang. RXRalpha inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Research*. 2013, 73, strony 3097-3108.
33. Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2013, 53, strony 401-426.
34. D Stewart E Killeen, R Naquin, S Alam, J Alam. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278, strony 2396-2402.
35. A Kobayashi MI Kang, H Okawa, M Ohtsuji, Y Zenke, T Chiba, K Igarashi, M Yamamoto. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and Cellular Biology*. 24, 2004, 16, strony 7130-7139.
36. T Suzuki J Maher, M Yamamoto. Select heterozygous Keap1 mutations have a dominant-negative effect on wild-type Keap1 in vivo. *Cancer research*. 2011, 71, strony 1700-1709.
37. N Wakabayashi K Itoh, J Wakabayashi, H Motohashi, S Noda, S Takahashi, S Imakado, T Kotsuji, F Otsuka, DR Roop, T Harada, JD Engel, M Yamamoto. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nature genetics*. 2003, 35, strony 238-245.
38. T Fukutomi K Takagi, T Mizushima, N Ohuchi, M Yamamoto. Kinetic, thermodynamic, and structural characterizations of the association between Nrf2-DLGex degron and Keap1. *Molecular and Cellular Biology*. 34, 2014, 5, strony 832-846.

39. R Saito T Suzuki, K Hiramoto, S Asami, E Naganuma, H Suda, T Iso, H Yamamoto, M Morita, L Baird, Y Furusawa, T Negishi, M Ichinose, M Yamamoto. Characterizations of three major cysteine sensors of Keap1 in stress response. *Molecular and Cellular Biology*. 36, 2015, 2, strony 271–284.
40. M McMahon DL Lamont, K Beattie, J Hayes. Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107, 2010, 44, strony 18838–18843.
41. AL Egger G Liu, JM Pezzuto, RB van Breemen, AD Mesecar. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, 102, strony 10070–10075.
42. DD Zhang M Hannink. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Molecular and cellular biology*. 2003, 23, strony 8137–8151.
43. K Takaya T Suzuki, H Motohashi, K Onodera, S Satomi, TW Kensler, M Yamamoto. Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 system. *Free radical biology & medicine*. 2012, 53, strony 817–827.
44. T Nguyen PJ Sherratt, P Nioi, CSYang, CB Pickett. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005, 280, strony 32485–32492.
45. GM DeNicola FA Karreth, TJ Humpton, A Gopinathan, C Wei, K Frese, D Mangal, KH Yu, CJ Yeo, ES Calhoun, F Scrimieri, JM Winter, RH Hruban, C Iacobuzio-Donahue, SE Kern, IA Blair, DA Tuveson. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*. 2011, 475, strony 106–109.
46. W Li N Thakor, EY Xu, Y Huang, C Chen, R Yu, M Holcik, A-N Kong. An internal ribosomal entry site mediates redox-sensitive translation of Nrf2. *Nucleic Acids Research*. 2010, 38, strony 778–788.
47. HC Huang T Nguyen, CB Pickett. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000, 97, strony 12475–12480.
48. Z Sun Z Huang, DD Zhang. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLOS ONE*. 2009, 4, str. e6588.
49. S Numazawa M Ishikawa, A Yoshida, S Tanaka, T Yoshida. Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2003, 285, strony C334–C342.

50. DA Bloom AK Jaiswal. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I κ Nrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278, strony 44675–44682.
51. AK Jain AK Jaiswal. GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007, 282, strony 16502–16510.
52. P Rada AI Rojo, S Chowdhry, M McMahon, JD Hayes, A Cuadrado. SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Molecular and Cellular Biology*. 2011, 31, strony 1121–1133.
53. S Chowdhry Y Zhang, M McMahon, C Sutherland, A Cuadrado, JD Hayes. Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene*. 2013, 32, strony 3765–3781.
54. AI Rojo MR Sagarra, A Cuadrado. GSK-3 β down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*. 2008, 105, strony 192-202.
55. KW Kang SJ Lee, JW Park, SG Kim. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Molecular Pharmacology*. 2002, 62, strony 1001–1010.
56. JH Lee TO Khor, L Shu, ZY Su, F Fuentes, AN Kong. Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression. *Pharmacology & therapeutics*. 2013, 137, strony 153–171.
57. SB Cullinan JA Diehl. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279, strony 20108–20117.
58. GM Fakhr FM Hagh, D Shanebandi, B Baradaran. DNA Methylation Pattern as Important Epigenetic Criterion in Cancer. *Genetics Research International*. 2013, 2013, str. 317569.
59. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*. 2002, 21, strony 5427–5240.
60. JP Issa HM Kantarjian. Targeting DNA methylation. *Clinical Cancer Research*. 2009, 15, strony 3938–3946.
61. AP Feinberg B Tycko. The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*. 2004, 4, strony 143–153.
62. RP Arasaradnam DM Commane, D Bradburn, JC Mathers. A review of dietary factors and its influence on DNA methylation in colorectal carcinogenesis. *Epigenetics*. 2008, 3, strony 193–198.

63. G Egger G Liang, A Aparicio, PA Jones. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004, 429, strony 457–463.
64. Esteller M. Epigenetics in cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2008, 358, strony 1148–1159.
65. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews Genetics*. 2009, 10, strony 704–714.
66. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *The New England Journal of Medicine*. 2005, 353, strony 1768–1771.
67. RS Redis I Berindan-Neagoe, VI Pop, GA Calin. Non-coding RNAs as theranostics in human cancers. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2012, 113, strony 1451–1459.
68. W Si J Shen, H Zheng, W Fan. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clinical Epigenetics*. 2019, 11, str. 25.
69. Y Peng CM Croce. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2016, 1, str. 15004.
70. P Karihtala K Porvari, Y Soini, KM Haapasaari. Redox Regulating Enzymes and Connected MicroRNA Regulators Have Prognostic Value in Classical Hodgkin Lymphomas. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017, 2017, str. 2696071.
71. D Ayers B Baron, T Hunter. miRNA Influences in NRF2 Pathway Interactions within Cancer Models. *Journal of Nucleic Acids*. 2015, 2015, str. 143636.
72. M Tertilt S Golda, K Skrzypek, U Florczyk, K Weglarczyk, J Kotlinowski, M Maleszewska, S Czauderna, C Pichon, C Kieda. Nrf2-heme oxygenase-1 axis in mucoepidermoid carcinoma of the lung: Antitumoral effects associated with down-regulation of matrix metalloproteinases. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015, 89, strony 147–157.
73. X Sun D Liu, Y Xue, X Hu. Enforced miR-144-3p Expression as a Non-Invasive Biomarker for the Acute Myeloid Leukemia Patients Mainly by Targeting NRF2. *Clinical Laboratory*. 2017, Tom 63, 4, strony 679-687.
74. C Sangokoya MJ Telen, JT Chi. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood*. 2010, 116, strony 4338–4348.
75. M Yang Y Yao, G Eades, Y Zhang, Q Zhou. MiR-28 regulates Nrf2 expression through a Keap1-independent mechanism. *Breast cancer research and treatment*. 2011, 129, strony 983–991.
76. N Li S Muthusamy, R Liang, H Sarojini, E Wang. Increased expression of miR-34a and miR-93 in rat liver during aging, and their impact on the expression of Mgst1 and Sirt1. *Mechanisms of ageing and development*. 2011, 132, strony 75–85.

77. G Eades M Yang, Y Yao, Y Zhang, Q Zhou. miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2011, 286, strony 40725–40733.
78. QL Liu J Zhang, X Liu, JY Gao. Role of growth hormone in maturation and activation of dendritic cells via miR-200a and the Keap1/Nrf2 pathway. *Cell Proliferation*. 2015, 48, strony 573–581.
79. M Narasimhan D Patel, D Vedpathak, M Rathinam, G Henderson, L Mahimainathan. Identification of novel microRNAs in post-transcriptional control of Nrf2 expression and redox homeostasis in neuronal, SH-SY5Y cells. *PLoS one*. 2012, 7, str. e51111.
80. B Akdemir Y Nakajima, J Inazawa, J Inoue. miR-432 induces NRF2 stabilization by directly targeting KEAP1. *Molecular Cancer Research*. 2017, 15, strony 1570–1578.
81. KA Jung S Lee, MK Kwak. NFE2L2/NRF2 Activity Is Linked to Mitochondria and AMP-Activated Protein Kinase Signaling in Cancers through miR-181c/Mitochondria-Encoded Cytochrome c Oxidase Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2017, 27, strony 945–961.
82. N Duru R Gernapudi, Y Zhang, Y Yao, PK Lo, B Wolfson, Q Zhou. NRF2/miR-140 signaling confers radioprotection to human lung fibroblasts. *Cancer Letters*. 2015, 369, strony 184–191.
83. L Shi L Wu, Z Chen, J Yang, X Chen, F Yu, F Zheng, X Lin. MiR-141 Activates Nrf2-Dependent Antioxidant Pathway via Down-Regulating the Expression of Keap1 Conferring the Resistance of Hepatocellular Carcinoma Cells to 5-Fluorouracil. *International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 2015, 35, strony 2333–2348.
84. L Shi ZG Chen, LL Wu, JJ Zheng, JR Yang, XF Chen, ZQ Chen, CL Liu, SY Chi, JY Zheng. miR-340 reverses cisplatin resistance of hepatocellular carcinoma cell lines by targeting Nrf2-dependent antioxidant pathway. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014, 15, strony 10439–10444.
85. NM Shah SA Rushworth, MY Murray, KM Bowles, DJ MacEwan. Understanding the role of NRF2-regulated miRNAs in human malignancies. *Oncotarget*. 2013, 4, strony 1130–1142.
86. NM Shah L Zaitseva, KM Bowles, DJ MacEwan, SA Rushworth. NRF2-driven miR-125B1 and miR-29B1 transcriptional regulation controls a novel anti-apoptotic miRNA regulatory network for AML survival. *Cell Death & Differentiation*. 2015, 22, strony 654–664.
87. JH Kim EY Xu, DB Sacks, J Lee, L Shu, B Xia, AN Kong. Identification and functional studies of a new Nrf2 partner IQGAP1: a critical role in the stability and transactivation of Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013, 19, strony 89–101.
88. KL Cheung JH Lee, L Shu, JH Kim, DB Sacks, AN Kong. The Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 mediates Nrf2 protein activation via the mitogen-activated protein

kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase (MEK)-ERK pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013, 288, strony 22378–22386.

89. MW Briggs DB Sacks. IQGAP1 as signal integrator: Ca²⁺, calmodulin, Cdc42 and the cytoskeleton. *FEBS letters*. 2003, 542, strony 7–11.

90. G Bjørkøy T Lamark, A Brech, H Outzen, M Perander, A Overvatn, H Stenmark, T Johansen. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of Cell Biology*. 2005, 171, strony 603–614.

91. M Komatsu H Kurokawa, S Waguri, K Taguchi, A Kobayashi, Y Ichimura, YS Sou, I Ueno, A Sakamoto, KI Tong, M Kim, Y Nishito, S Iemura, T Natsume, T Ueno, E Kominami, H Kominami, H Motohashi, K Tanaka, M Yamamoto. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature Cell Biology*. 2010, 12, strony 213–223.

92. IM Copple A Lister, AD Obeng, NR Kitteringham, RE Jenkins, R Layfield, BJ Foster, CE Goldring, BK Park. Physical and functional interaction of sequestosome 1 with Keap1 regulates the Keap1-Nrf2 cell defense pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285, strony 16782–16788.

93. A Lau XJ Wang, F Zhao, NF Villeneuve, T Wu, T Jiang, Z Sun, E White, DD Zhang. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Molecular and Cellular Biology*. 2010, 30, strony 3275–3285.

94. A Jain T Lamark, E Sjøttem, KB Larsen, JA Awuh, A Øvervatn, M McMahon, JD Hayes, T Johansen. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *The Journal of biological chemistry*. 2010, 285, strony 22576–22591.

95. A Lau Y Zheng, S Tao, H Wang, SA Whitman, E White, DD Zhang. Arsenic inhibits autophagic flux, activating the Nrf2-Keap1 pathway in a p62-dependent manner. *Molecular and Cellular Biology*. 2013, 33, strony 2436–2446.

96. L Ma J Liu, X Zhang, J Qi, W Yu, Y Gu. p38 MAPK-dependent Nrf2 induction enhances the resistance of glioma cells against TMZ. *Medical Oncology*. 2015, 32, str. 69.

97. H Fan C Paiboonrungruan, X Zhang, JR Prigge, EE Schmidt, Z Sun, X Chen. Nrf2 regulates cellular behaviors and Notch signaling in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017, 493, strony 833–839.

98. M Osaki M Oshimura, H Ito. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 2004, 9, strony 667–676.

99. F Chang JT Lee, PM Navolanic, LS Steelman, JG Shelton, WL Blalock, RA Franklin, JA McCubrey. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: A target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 2003, 17, strony 590–603.

100. D Liu Y Zhang, Y Wei, G Liu, Y Liu, Q Gao, L Zou, W Zeng, N Zhang. Activation of AKT pathway by Nrf2/PDGFA feedback loop contributes to HCC progression. *Oncotarget*. 2016, 7, strony 65389–65402.
101. A Lau NF Villeneuve, Z Sun, PK Wong, DD Zhang. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2008, 58, strony 262-270.
102. F He L Antonucci, M Karin. NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer. *Carcinogenesis*. 2020, 41, strony 405-416.
103. MH Ludtmann PR Angelova, Y Zhang, AY Abramov, AT Dinkova-Kostova. Nrf2 affects the efficiency of mitochondrial fatty acid oxidation. *Biochemical*. 2014, 457, strony 415–424.
104. J Bastin A Lopes-Costa, F Djouadi. Exposure to resveratrol triggers pharmacological correction of fatty acid utilization in human fatty acid oxidation-deficient fibroblasts. *Human Molecular Genetics*. 2011, 20, strony 2048–2057.
105. BN Chorley MR Campbell, X Wang, M Karaca, D Sambandan, F Bangura, P Xue, J Pi, SR Kleeberger, DA Bell. Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Research*. 2012, 40, strony 7416–7429.
106. T Rangasamy CY Cho, RK Thimmulappa, L Zhen, SS Srisuma, TW Kensler. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2004, 114, strony 1248–1259.
107. T Rangasamy J Guo, WA Mitzner, J Roman, A Singh, AD Fryer. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *Journal of Experimental Medicine*. 2005, 202, strony 47–59.
108. RK Thimmulappa H Lee, T Rangasamy, SP Reddy, M Yamamoto, TW Kensler, S Biswal. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *Journal of Clinical Investigation*. 2006, 116, strony 984–995.
109. RK Thimmulappa C Scollick, K Traore, M Yates, MA Trush, KT Liby, MB Sporn, M Yamamoto, TW Kensler, S Biswal. Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006, 351, strony 883–889.
110. CE Hochmuth B Biteau, D Bohmann, H Jasper. Redox regulation by Keap1 and Nrf2 controls intestinal stem cell proliferation in *Drosophila*. *Cell Stem Cell*. 2011, 8, strony 188–199.
111. E Hinoi S Fujimori, L Wang, H Hojo, K Uno, Y Yoneda. Nrf2 negatively regulates osteoblast differentiation via interfering with Runx2-dependent transcriptional activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, 30, strony 18015-18024.

112. BN Nakamura G Lawson, JY Chan, J Banuelos, MM Cortés, YD Hoang, L Ortiz, BA Rau, U Luderer. Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010, 49, strony 1368–1379.
113. N Wakabayashi JJ Skoko, DV Chartoumpekis, S Kimura, SL Slocum, K Noda, DL Palliyaguru, M Fujimuro, PA Boley, Y Tanaka. Notch-Nrf2 axis: regulation of Nrf2 gene expression and cytoprotection by notch signaling. *Molecular and Cellular Biology*. 2014, 34, strony 653–663.
114. S Shin N Wakabayashi, V Misra, S Biswal, GH Lee, ES Agoston, M Yamamoto, TW Kensler. NRF2 modulates aryl hydrocarbon receptor signaling: influence on adipogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 2007, 27, strony 7188–7197.
115. K Sinha PB Pal, PC Sil. Cadmium, (Cd 2+) exposure differentially elicits both cell proliferation and cell death related responses in SK-RC-45. *Toxicology in Vitro*. 2014, 28, strony 307–318.
116. J Das PC Sil. Taurine ameliorates alloxan-induced diabetic renal injury, oxidative stress-related signaling pathways and apoptosis in rats. *Amino Acids*. 2012, 43, strony 1509–1523.
117. K Rashid PC Sil. Curcumin enhances recovery of pancreatic islets from cellular stress induced inflammation and apoptosis in diabetic rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2015, 282, strony 297–310.
118. M Suzuki A Otsuki, N Keleku-Lukwete, M Yamamoto. Overview of redox regulation by Keap1–Nrf2 system in toxicology and cancer. *Current Opinion in Toxicology*. 2016, 1, strony 29–36.
119. Barnes PJ. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Antioxidants*. 2022, 11, str. 965.
120. L Mao H Wang, X Wang, H Liao, X Zhao. Transcription factor Nrf2 protects the spinal cord from inflammation produced by spinal cord injury. *Journal of Surgical Research*. 2011, 170, strony e105-e115.
121. L Mao HD Wang, XL Wang, L Tian, JY Xu. Disruption of Nrf2 exacerbated the damage after spinal cord injury in mice. *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2012, 72, strony 189–198.
122. J Tu X Zhang, Y Zhu, Y Dai, N Li, F Yang, Q Zhang, DW Brann, R Wang. Cell-Permeable Peptide Targeting the Nrf2-Keap1 Interaction: A Potential Novel Therapy for Global Cerebral Ischemia. *The Journal of Neuroscience*. 2015, 35, strony 14727–14739.
123. CL Saw MT Huang, Y Liu, TO Khor, AH Conney, AN Kong. Impact of Nrf2 on UVB-induced skin inflammation/photoprotection and photoprotective effect of sulforaphane. *Molecular Carcinogenesis*. 2011, 50, strony 479–486.

124. A Hirota Y Kawachi, K Itoh, Y Nakamura, X Xu, T Banno, T Takahashi, M Yamamoto, F Otsuka. Ultraviolet, A irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts: protective role in UVA-induced apoptosis. 2005, 124, strony 825–832.
125. WO Osburn MS Yates, PD Dolan, KT Liby, MB Sporn, K Taguchi, M Yamamoto, TW Kensler. Genetic or Pharmacologic Amplification of Nrf2 Signaling Inhibits Acute Inflammatory Liver Injury in Mice. *Toxicological Sciences*. 2008, 104, strony 218–227.
126. S Kannan VR Muthusamy, KJ Whitehead, L Wang, AV Gomes, SE Litwin, TW Kensler, ED Abel, JR Hoidal, NS Rajasekaran. Nrf2 deficiency prevents reductive stress-induced hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovascular research*. 2013, cvt150.
127. H Zheng SA Whitman, W Wu, GT Wondrak, PK Wong, D Fang, DD Zhang. Therapeutic potential of Nrf2 activators in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2011, 60, strony 3055–3066.
128. SF Nabavi AJ Barber, C Spagnuolo, GL Russo, M Daglia, SM Nabavi, E Sobarzo-Sánchez. Nrf2 as molecular target for polyphenols: a novel therapeutic strategy in diabetic retinopathy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2016, 53, strony 293–312.
129. Y Okano U Nezu, Y Enokida, MTM Lee, H Kinoshita, A Lezhava, Y Hayashizaki, S Morita, M Taguri, Y Ichikawa. SNP. (–617C > A) in ARE-like loci of the NRF2 gene: a new biomarker for prognosis of lung adenocarcinoma in Japanese non-smoking women. *PLoS One*. 2013, 8, str. e73794.
130. T Shibata A Kokubu, S Saito, M Narisawa-Saito, H Sasaki, K Aoyagi, Y Yoshimatsu, Y Tachimori, R Kushima, T Kiyono. NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer. *Neoplasia*. 2011, 13, strony 864–873.
131. T Jiang N Chen, F Zhao, X-J Wang, B Kong, W Zheng, DD Zhang. High levels of Nrf2 determine chemoresistance in type II endometrial cancer. *Cancer Research*. 2010, 70, strony 5486-5496.
132. B Padmanabhan KI Tong, T Ohta, Y Nakamura, M Scharlock, M Ohtsuji, M-II Kang, A Kobayashi, S Yokoyama, M Yamamoto. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Molecular Cell*. 2006, 21, strony 689–700.
133. M Cykowiak V Krajka-Kuźniak. Role of Nrf2 in Pancreatic Cancer. *Antioxidants*. 2022, 11, str. 98.
134. T Ohta K Iijima, M Miyamoto, I Nakahara, H Tanaka, M Ohtsuji, T Suzuki, A Kobayashi, J Yokota, T Sakiyama, T Shibata, M Yamamoto, S Hirohashi. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Research*. 2008, 68, strony 1303–1309.
135. QK Li A Singh, S Biswal, F Askin, E Gabrielson. KEAP1 gene mutations and NRF2 activation are common in pulmonary papillary adenocarcinoma. *Journal of Human Genetics*. 2011, 56, strony 230–234.

136. T Takahashi M Sonobe, T Menju, E Nakayama, N Mino, S Iwakiri, S Nagai, K Sato, R Miyahara, K Okubo, T Hirata, H Date, H Wada. Mutations in Keap1 are a potential prognostic factor in resected non-small cell lung cancer. *Journal of Surgical Oncology*. 2010, 101, strony 500-506.
137. T Sjöblom S Jones, LD Wood, DW Parsons, J Lin, TD Barber, D Mandelker, RJ Leary, J Ptak, N Silliman, S Szabo, P Buckhaults, C Farrell, P Meeh, SD Markowitz, J Willis, D Dawson, JKV Willson, AF Gazdar, J Hartigan, L Wu, C Liu, B Parmigiani, BH Park. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2006, 314, strony 268–274.
138. P Nioi T Nguyen. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007, 362, strony 816–821.
139. T Shibata A Kokubu, M Gotoh, H Ojima, T Ohta, M Yamamoto, S Hirohashi. Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterolog*. 2008, 135, strony 1358–1368.
140. A Raghunath K Sundarraj, F Arfuso, G Sethi, E Perumal. Dysregulation of Nrf2 in Hepatocellular Carcinoma: Role in Cancer Progression and Chemoresistance. *Cancers*. 2018, 10, str. 481.
141. PA Konstantinopoulos D Spentzos, E Fountzilias, N Francoeur, S Sanisetty, AP Grammatikos, JL Hecht, SA Cannistra. Keap1 mutations and Nrf2 pathway activation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Research*. 2011, 71, strony 5081–5089.
142. TF Wong K Yoshinaga, Y Monma, K Ito, H Niikura, S Nagase, M Yamamoto, N Yaegashi. Association of keap1 and nrf2 genetic mutations and polymorphisms with endometrioid endometrial adenocarcinoma survival. *The International Journal of Gynecological Cancer*. 2011, 21, strony 1428–1435.
143. YR Kim JE Oh, MS Kim, MR Kang, SW Park, JY Han, HS Eom, NJ Yoo, SH Lee. Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *The Journal of Pathology*. 2010, 220, strony 446–451.
144. [Online] Dostęp na dzień 13.05.2023. <https://www.cancer.gov/ccg/>.
145. [Online] Dostęp na dzień 21.05.2023. https://portal.gdc.cancer.gov/exploration?filters=%7B%22op%22%3A%22and%22%2C%22content%22%3A%5B%7B%22op%22%3A%22in%22%2C%22content%22%3A%7B%22field%22%3A%22cases.available_variation_data%22%2C%22value%22%3A%5B%22ssm%22%5D%7D%7D%2C%7B%22op%22%3A%22in%22%2C
146. [Online] Dostęp na dzień 21.05.2023. https://portal.gdc.cancer.gov/exploration?filters=%7B%22op%22%3A%22and%22%2C%22content%22%3A%5B%7B%22op%22%3A%22in%22%2C%22content%22%3A%7B%22field%22%3A%22cases.available_variation_data%22%2C%22value%22%3A%5B%22ssm%22%5D%7D%7D%2C%7B%22op%22%3A%22in%22%2C

147. Network Cancer Genome Atlas Research. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012, 489, strony 519–525.
148. R Govindan L Ding, M Griffith, J Subramanian, ND Dees, KL Kanchi, CA Maher, R Fulton, L Fulton, J Wallis, K Chen. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell*. 2012, 150, strony 1121–1134.
149. JM Kerins A Ooi. A catalogue of somatic NRF2 gain-of-function mutations in cancer. *Scientific Reports*. 2018, 8, str. 12846.
150. A Forner JM Llovet, J Bruix. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2012, 379, strony 1245–1255.
151. K Schulze S Imbeaud, E Letouzé, LB Alexandrov, J Calderaro, S Rebouissou, G Couchy, C Meiller, J Shinde, F Soysouvanh, AL Calatayud. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nature Genetics*. 2015, 47, strony 505–511.
152. A Lister T Nedjadi, NR Kitteringham, F Campbell, E Costello, B Lloyd, IM Copple, S Williams, A Owen, JP Neoptolemos. Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy. *Molecular Cancer Research*. 2011, 10, str. 37.
153. S Mirzaei AT Mohammadi, MH Gholami, F Hashemi, A Zarrabi, A Zabolian, K Hushmandi, P Makvandi, M Samec, A Liskova, P Kubatka, N Nabavi, AR Aref, M Ashrafizadeh, H Khan, M Najafi. Nrf2 signaling pathway in cisplatin chemotherapy: Potential involvement in organ protection and chemoresistance. *Pharmacological Research*. 2021, 167, str. 105575.
154. P Pölönen AL Levonen. Insights into the role of NRF2 in cancer provided by cancer genomics. *Current Opinion in Toxicology*. 2016, 1, strony 111-117.
155. GS Shim S Manandhar, DH Shin, TH Kim, MK Kwak. Acquisition of doxorubicin resistance in ovarian carcinoma cells accompanies activation of the NRF2 pathway. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009, 47, strony 1619–1631.
156. S Huang T He, S Yang, H Sheng, X Tang, F Bao, Y Wang, X Lin, W Yu, F Cheng, W Lv, J Hu. Metformin reverses chemoresistance in non-small cell lung cancer via accelerating ubiquitination-mediated degradation of Nrf2. *Translational Lung Cancer Research*. 2020, 9, strony 2337-2355.
157. D Ren NF Villeneuve, T Jiang, T Wu, A Lau, HA Toppin, DD Zhang. Brutal enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011, 108, strony 1433–1438.
158. X Sun Q Wang, Y Wang, L Du, C Xu, Q Liu. Brutal Enhances the Radiosensitivity of A549 Cells by Promoting ROS Production and Enhancing DNA Damage. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, 17, str. 997.

159. SJ Cai Y Liu, S Han, C Yang. Brusatol, an NRF2 inhibitor for future cancer therapeutic. *Cell & Bioscience*. 2019, 9, str. 45.
160. S Vartanian TP Ma, J Lee, PM Haverty, DS Kirkpatrick, K Yu, D Stokoe. Application of Mass Spectrometry Profiling to Establish Brusatol as an Inhibitor of Global Protein Synthesis. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2016, 15, strony 1220–1231.
161. X Tang H Wang, L Fan, X Wu, A Xin, H Ren, XJ Wang. Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011, 50, strony 1599–1609.
162. S Chian R Thapa, Z Chi, XJ Wang, X Tang. Luteolin inhibits the Nrf2 signaling pathway and tumor growth in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014, 447, strony 602–608.
163. P Huppke S Weissbach, JA Church, R Schnur, M Krusen, S Dreha-Kulaczewski, WN Kühn-Velten, A Wolf, B Huppke, F Millan, A Begtrup, F Almusafri, H Thiele, J Altmüller, P Nürnberg, M Müller, J Gärtner. Activating de novo mutations in NFE2L2 encoding NRF2 cause a multisystem disorder. *Nature Communications*. 2017, 818, str. 8.
164. C Xie X Zhou, C Liang, X Li, M Ge, Y Chen, J Yin, J Zhu, C Zhong. Apatinib triggers autophagic and apoptotic cell death via VEGFR/STAT3/PD-L1 and ROS/Nrf2/p62 signaling in lung cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2021, 40, str. 266.
165. A Singh S Venkannagari, KH Oh, Y-Q Zhang, JM Rohde, L Liu, S Nimmagadda, K Sudini, KR Brimacombe, S Gajghate, J Ma, A Wang, X Xu, SA Shahane, M Xia, J Woo, GA Mensah, Z Wang, M Ferrer, E Gabrielson, Z Li, F Rastinejad, M Shen, MB Boxer, S Biswal. Small Molecule Inhibitor of NRF2 Selectively Intervenes Therapeutic Resistance in KEAP1-Deficient NSCLC Tumors. *ACS Chemical Biology*. 2016, 11, strony 3214–3225.
166. MJ Bollong H Yun, L Sherwood, AK Woods, LL Lairson, PG Schultz. A Small Molecule Inhibits Deregulated NRF2 Transcriptional Activity in Cancer. *ACS Chemical Biology*. 2015, 10, strony 2193–2198.
167. S Lee MJ Lim, MH Kim, CH Yu, YS Yun, J Ahn, JY Song. An effective strategy for increasing the radiosensitivity of Human lung Cancer cells by blocking Nrf2-dependent antioxidant responses. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012, 53, strony 807–816.
168. HY Liu A Tuckett, M Fennell, R Garippa, JL Zakrzewski. Repurposing of the CDK inhibitor PHA-767491 as a NRF2 inhibitor drug candidate for cancer therapy via redox modulation. *Investigational New Drugs*. 2018, 36, strony 590–600.
169. JL Roh EH Kim, H Jang, D Shin. Nrf2 inhibition reverses the resistance of cisplatin resistant head and neck cancer cells to artesunate-induced ferroptosis. *Redox Biology*. 2017, 11, strony 254–262.
170. K Tsuchida T Tsujita, M Hayashi, A Ojima, N Keleku-Lukwete, F Katsuoka, A Otsuki, H Kikuchi, Y Oshima, M Suzuki, M Yamamoto. Halofuginone enhances the chemo-sensitivity

of cancer cells by suppressing NRF2 accumulation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017, 103, strony 236-247.

171. J Dong Y Li, H Xiao, D Luo, S Zhang, C Zhu, M Jiang, M Cui, L Lu, S Fan. Cordycepin sensitizes breast cancer cells toward irradiation through elevating ROS production involving Nrf2. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2019, 364, strony 12–21.

172. AM Gao ZP Ke, F Shi, GC Sun, H Chen. Chrysin enhances sensitivity of BEL-7402/ADM cells to doxorubicin by suppressing PI3K/Akt/Nrf2 and ERK/Nrf2 pathway. *Chemico-Biological Interactions*. 2013, 206, strony 100-108.

173. AM Gao XY Zhang, ZP Ke. Apigenin sensitizes BEL-7402/ADM cells to doxorubicin through inhibiting miR-101/Nrf2 pathway. *Oncotarget*. 2017, 8, strony 82085–82091.

174. X Xu Y Yang, X Liu, N Cao, P Zhang, S Zhao, D Chen, L Li, Y He, X Dong, K Wang, H Lin, N Mao, L Liu. NFE2L2/KEAP1 Mutations Correlate with Higher Tumor Mutational Burden Value/PD-L1 Expression and Potentiate Improved Clinical Outcome with Immunotherapy. *Oncologist*. 2020, 25, strony e955–e963.

175. G Boysen A Jamshidi-Parsian, MA Davis, ER Siegel, CM Simecka, RA Kore, RPM Dings, RJ Griffin. Glutaminase inhibitor CB-839 increases radiation sensitivity of lung tumor cells and human lung tumor xenografts in mice. *International Journal of Radiation Biology*. 2019, 95, strony 436–442.

176. E Mullarky NC Lucki, RB Zavareh, JL Anglin, AP Gomes, BN Nicolay, JCY Wong, S Christen, H Takahashi, PK Singh, J Blenis, JD Warren, S-M Fendt, JM Asara, GM DeNicola, CA Lyssiotis, LL Lairson, LC Cantley. Identification of a small molecule inhibitor of 3-phosphoglycerate dehydrogenase to target serine biosynthesis in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016, 113, strony 1778–1783.

177. L Mele F Paino, F Papaccio, T Regad, D Boocock, P Stiuso, A Lombardi, D Liccardo, G Aquino, A Barbieri, C Arra, C Coveney, M La Noce, G Papaccio, M Caraglia, V Tirino, V Desiderio. A new inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase blocks pentose phosphate pathway and suppresses malignant proliferation and metastasis in vivo. *Cell Death Disease*. 2018, 9, str. 572.

178. HR Lee JM Cho, DH Shin, CS Yong, HG Choi, N Wakabayashi, MK Kwak. Adaptive response to GSH depletion and resistance to L-buthionine-(S,R)-sulfoximine: Involvement of Nrf2 activation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2008, 31, strony 23–31.

179. Y Zhao T Seefeldt, W Chen, L Carlson, A Stoeber, S Hanson, R Foll, DP Matthees, S Palakurthi, X Guan. Increase in thiol oxidative stress via glutathione reductase inhibition as a novel approach to enhance cancer sensitivity to X-ray irradiation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009, 47, strony 176–183.

180. L Sleire BS Skeie, IA Netland, HE Førde, E Dadoo, F Selheim, L Leiss, JI Heggdal, P-H Pedersen, J Wang, PØ Enger. Drug repurposing: sulfasalazine sensitizes gliomas to gamma

knife radiosurgery by blocking cystine uptake through system Xc-, leading to glutathione depletion. *Oncogene*. 2015, 34, strony 5951–5959.

181. SJ Dixon DN Patel, M Welsch, R Skouta, ED Lee, M Hayano, AG Thomas, CE Gleason, NP Tatonetti, BS Slusher, BR Stockwell. Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *eLife*. 2014, 3, str. e02523.

182. [Online] [Zacytowano:]
<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=NFE2L2#distribution>.

183. [Online] [Zacytowano:]
<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=KEAP1#distribution>.

184. E Nadal R Palmero, C Muñoz-Pinedo. Mutations in the Antioxidant KEAP1/NRF2 Pathway Define an Aggressive Subset of NSCLC Resistant to Conventional Treatments. *Journal of Thoracic Oncology*. 14, 2019, 11, strony 1881-1883.

185. M Gong Y Li, X Ye, L Zhang, Z Wang, X Xu, Y Shen, C Zheng. Loss-of-function mutations in KEAP1 drive lung cancer progression via KEAP1/NRF2 pathway activation. *Cell Communication and Signaling*. 2020, 18.

186. A Singh V Misra, RK Thimmulappa, H Lee, S Ames, MO Hoque, JG Herman, SB Baylin, D Sidransky, E Gabrielson, MV Brock, S Biswal. Dysfunctional KEAP1–NRF2 Interaction in Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLoS Medicine*. 2006, 10, str. e420.

187. M Abazeed C Xu, D Adams, P Tamayo, J Loeffler, J Suh, M Meyerson, K Wong, P Hammerman. NRF2 Is a Novel Oncogene and Biomarker of Therapeutic Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics*. 90, 2014, 5, str. 53.

188. A Namani MM Rahaman, M Chen, X Tang. Gene-expression signature regulated by the KEAP1-NRF2-CUL3 axis is associated with a poor prognosis in head and neck squamous cell cancer. *BMC Cancer*. 18, 2018, 46.

189. S Fulda D Kögel. Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene*. 2015, 34, strony 5105–5113.

190. M McMahon N Thomas, K Itoh, M Yamamoto, JD Hayes. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a “tethering” mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, 281, strony 24756–24768.

191. S Kurinna M Schafer, P Ostano, E Karouzakis, G Chiorino, W Bloch, A Bachmann, S Gay, D Garrod, K Lefort. A novel Nrf2-miR-29-desmocollin-2 axis regulates desmosome function in keratinocytes. *Nature Communications*. 2014, 5, str. 5099.

X. WYKAZ TABEL

Tabela 1. Efekty jakie wywierają poszczególne kinazy na NRF2.	13
Tabela 2. Tabela przedstawienie substancji które hamują białka docelowe NRF2.....	23
Tabela 3. Startery użyte do namnożenia egzonu 2 <i>NFE2L2</i> oraz 6 eksonów <i>KEAP1</i>	28
Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR.....	29
Tabela 5. Skład mieszaniny użytej do reakcji sekwencjonowania.	32
Tabela 6. Zestawienie wykrytych wariantów sekwencyjnych wśród 88 pacjentów z NSCLC. .	37

XI. WYKAZ RYCIN

Rycina 1. Podłoże genetyczne raka płuca.	7
Rycina 2. Położenie NFE2L2 na chromosomie drugim (14).	8
Rycina 3. Struktura NRF2.	10
Rycina 4. Ścieżka sygnałowa NRF2-KEAP1.	11
Rycina 5. Powiązanie innych ścieżek sygnałowych i szlaku NRF2-KEAP1.	17
Rycina 6. Rola NRF2.	18
Rycina 7. Schemat metodyki badania.	26
Rycina 8. Procedura postępowania podczas izolacji DNA przy użyciu zestawu NucleoSpin® Tissue Column firmy Machery – Nagel.	27
Rycina 9. Profil termiczny zastosowany w reakcji PCR.	30
Rycina 10. Procedura postępowania podczas oczyszczania produktów PCR z agarozy za pomocą NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up firmy Machery – Nagel.	31
Rycina 11. Profil termiczny reakcji sekwencjonowania.	32
Rycina 12. Procedura postępowania podczas usuwania terminatorów reakcji przy użyciu zestawu ExTerminator firmy A&A Biotechnology™.	33
Rycina 13. Wykres przedstawiający ilość pacjentów ,z wyodrębnieniem płci , w zależności od stopnia zróżnicowania guza.	35
Rycina 14. Wykres przedstawiający zestawienie przedziałów wiekowych pod względem stopnia zróżnicowania guza.	36
Rycina 15. Wynik sekwencjonowania KEAP1 u pacjenta 123.	38
Rycina 16. Wynik sekwencjonowania KEAP1 u pacjenta 201.	38
Rycina 17. Wynik sekwencjonowania KEAP1 u pacjenta 221.	39
Rycina 18. Wynik sekwencjonowania KEAP1 u pacjenta 389.	39
Rycina 19. Wynik sekwencjonowania KEAP1 u pacjenta 408.	40
Rycina 20. Wynik sekwencjonowania KEAP1 u pacjenta 492.	40
Rycina 21. Wynik sekwencjonowania KEAP1 u pacjenta 504.	41
Rycina 22. Wynik sekwencjonowania NFE2L2 u pacjenta 154.	41
Rycina 23. Wynik sekwencjonowania NFE2L2 u pacjenta 196.	41