

Nrf2 – dve tváre regulátora antioxidantného systému

Nrf2 – Two Faces of Antioxidant System Regulation

Pastorek M., Müller P., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Súhrn

Signálna dráha riadená komplexom transkripčného faktora Nrf2 a jeho represora Keap1 je súčasťou jedného z najdôležitejších defenzívnych mechanizmov bunky, ktorý ju ochraňuje pred stresom. Po uvoľnení proteínu Keap1 z komplexu Nrf2-Keap1 dochádza k translokácii Nrf2 do jadra, kde cez zvýšenie expície cytoprotektívnych génov pomáha bunke zvládnuť oxidačný stres vyvolaný účinkom toxických či karcinogénnych látok. Nie je preto prekvapujúce, že indukcia Nrf2 chemopreventívnymi látkami môže mať potenciál pri prevencii nádorových ochorení. Podobne ako Nrf2 ochraňuje bunky zdravého tkaniva, v neoplastických bunkách môže zmierniť účinok chemoterapeutík, a podporiť tak progresiu rakoviny. Je dokázané, že zvýšená expresia a následná nadmerná akumulácia Nrf2 je u mnohých typov nádorov asociovaná so zlou prognózou liečby a prispieva aj k fenoménu liekovej rezistencie. Poznanie „dvoch tvárí“ Nrf2 ako aj aktivácie ním riadenej signálnej dráhy je preto dôležité nielen pre základný výskum, ale má aj klinické implikácie.

Klíčovú slová

Nrf2 – Keap1 – antioxidant – lieková rezistencia – chemoprevenca

Summary

One of the most prominent defense mechanisms of cells undergoing stress is the Nrf2-Keap1 signaling pathway. After exposure to either carcinogens or toxic compounds inducing oxidative stress, attacked cells react by release of Keap1 from the Nrf2-Keap1 complex. Freeing Nrf2 from the complex allows its translocation into the nucleus, thus enabling start of the transcriptional program of cytoprotective genes. Therefore, induction of Nrf2 by chemopreventive compounds may show potential in cancer prevention. But while it protects normal cells, increased activity of Nrf2 signaling pathway also facilitates cancer progression and protects neoplastic cells from therapeutic agents. Increased expression and subsequent accumulation of Nrf2 contributes to acquired drug resistance and is often associated with worse prognosis. Knowing 'both faces' of Nrf2 signaling pathway is thus relevant not only for basic research but has also substantial clinical implications.

Key words

Nrf2 – Keap1 – antioxidant – drug resistance – chemoprevention

Práca bola podporená Európskym fondom pre regionálny rozvoj a štátnym rozpočtom Českej republiky (RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101), projektom MŠMT – NPU I – LO1413, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a BBMRI_CZ (LM2010004).

This study was supported by European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101), MEYS – NPS I – LO1413, MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and by BBMRI_CZ (LM2010004).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Michal Pastorek, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: michal.pastorek@mou.cz

Obdržané/Submitted: 9. 4. 2015

Prijaté/Accepted: 15. 6. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152S26>

Úvod

Nrf2-Keap1 signálna dráha je hlavným regulátorom bunkovej odpovede na stres spôsobený elektrofilmi a reaktívnymi formami kyslíka (reactive oxygen species – ROS). Preto je tradične vnímaná ako dôležitý obranný mechanizmus. Aj keď je tento pohľad správny, v poslednej dobe sa objavujú dôkazy o jej zapojení do vytvárania vhodného prostredia podporujúceho prežívanie a proliferáciu nádorových buniek. Akumulácia Nrf2 pomáha nádorovým bunkám lepšie odolávať stresu vyvolanému terapiou a táto jej „druhá tvár“ sa stala predmetom záujmu výskumu, ktorého cieľom je lepšie pochopiť úlohu Nrf2 signálnej dráhy v rakovine a vytvoriť stratégie na jej inhibíciu.

Štruktúra Nrf2 a Keap1

Pre pochopenie regulácie signálnej dráhy Nrf2-Keap1 je najprv potrebné poznať štruktúru jej hlavných aktérov. Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor 2) je transkripčný faktor, ktorý obsahuje sedem funkčných domén, známych ako Neh1–7. Z nich je pre reguláciu Nrf2 kľúčová najmä doména Neh2. Obsahuje sedem lyzínových rezíduí, na ktoré sa viaže ubikvitín, a tiež dve väzobné miesta (ETGE a DLG), ktoré pomáhajú regulovať jeho stabilitu prostredníctvom interakcie s jeho partnerom Keap1 (Kelch-like erythroid cell-derived protein with CNC homology [ECH]-associated protein 1) [1–4]. Pre stabilitu Nrf2 je rovnako dôležitá na serín bohatá doména Neh6 [5] a domény Neh3–5 sú potrebné pre transaktivačnú aktivitu Nrf2 [5,6]. Doména Neh1, ktorá obsahuje leucínový zips, zase reguluje väzbu transkripčného faktora na DNA a dimerizáciu Nrf2 s Maf [7].

Keap1 obsahuje tri hlavné domény, riadiace jeho aktivitu: Kelch, BTB a IVR. Kelch/DGR doména sprostredkuje väzbu Keap1 s Neh2 doménou Nrf2 [2,8]. BTB doména je dôležitá pre homodimerizáciu Keap1 a väzbu s proteínom Cul3 a IVR doména s vyšším obsahom cysteínových rezíduí spája BTB doménu s C koncom Kelch/DGR domény [9].

Regulácia signálnej dráhy Nrf2-Keap1

V bežných podmienkach je Nrf2 lokalizovaný v komplexe s Keap1, ktorý jeho

hladinu udržiava na bazálnej úrovni. Prostredníctvom Kelch domén sa Keap1 viaže na Nrf2 v dvoch miestach Neh2 domény – prvá väzba na ETGE miesto má vyššiu afinitu a zabezpečuje naviazanie Keap1 na Nrf2 a následná väzba s nižšou afinitou na miesto DLG reguluje správnu orientáciu oboch proteínov. Po naviazaní oboch väzieb sa sedem ubikvitín akceptujúcich lyzínov dostane do pozície, v ktorej dochádza k ich polyubikvitinácii, a oba proteíny tak môžu byť degradované v 26S podjednotke proteazómu [10,11]. V celom procese hrá dôležitú úlohu aj USP15 (ubiquitin-specific peptidase 15) – deubikvitinačný enzým, ktorý stabilizuje Keap1 a posilňuje jeho E3 ligázovú aktivitu, čo nakoniec umožňuje väzbu Nrf2 [12].

Ak je bunka vystavená pôsobeniu xenobiôtik alebo oxidačnému stresu, dochádza k modifikácii cysteínov, ktoré sa nachádzajú v reakčnom mieste Keap1. Jeho schopnosť udržať si správnu terciárnu štruktúru je tým znížená, čo zabráni jeho väzbe na Nrf2 a jeho následnej polyubikvitinácii a degradácii. Podľa inej teórie následkom modifikácie tiolov dochádza k disociácii Cul3 ligázy od Keap1 [13]. Spoločným aspektom oboch modelov je znemožnenie interakcie Keap1 a Nrf2, ktorý môže byť po oddelení z komplexu aktivovaný a translokovaný do jadra. Tam s Maf proteínmi vytvorí transkripčný komplex rozpoznávajúci ARE (antioxidant response element) miesta v promótoroch a riadi expresiu génov, ako sú *NAD(P)H chinón oxidoreduktáza 1*, *hém oxygenáza 1*, *glutatión S transferáza* či *glutamát-cysteín ligáza* (obr. 1) [14].

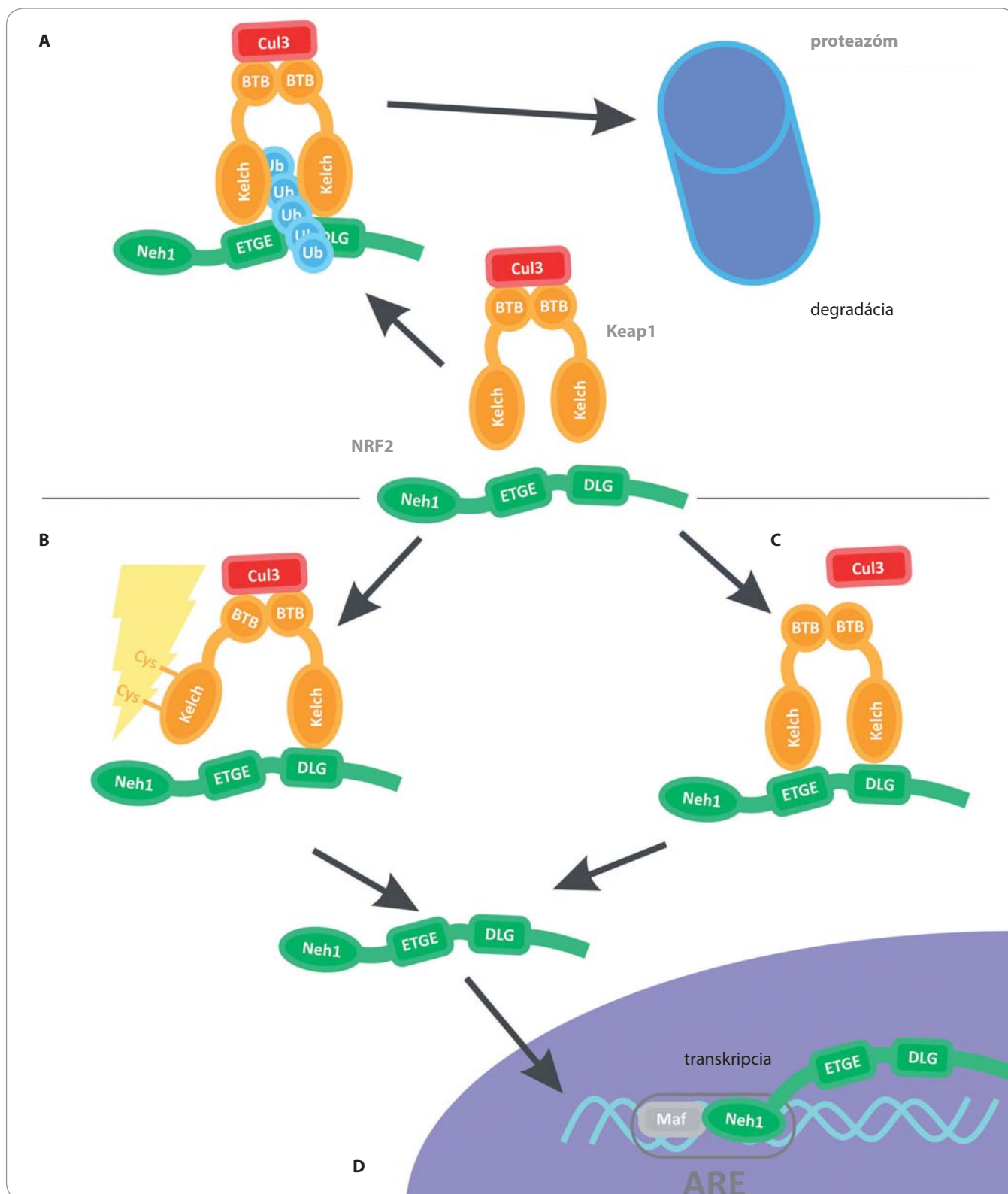
Nrf2 ako nádorový supresor

Hlavnou funkciou Nrf2 je aktivácia antioxidantnej odpovede pomocou transaktívacie širokého spektra génov (napr. gén kódujúci hém-oxygenázu, gény riadiace syntézu glutatiónu). Vďaka rýchlej odpovedi na prítomnosť xenobiôtik alebo oxidačného stresu je táto signálna dráha tradične vnímaná ako jeden z hlavných obranných mechanizmov bunky a dôležitý regulátor jej prežívania. Je dokázané, že aktivácia Nrf2 hrá dôležitú úlohu pri ochrane pred diabetom, starnutím, neurodegeneračnými a kardiovaskulárnymi

ochoreniami a v neposlednom rade aj pred nádorovými ochoreniami [15,16]. Niekoľko štúdií na myšiach s vyradením génu pre Nrf2 – *NFE2L2* – ukázalo, že v porovnaní s kontrolnými myšami jeho neprítomnosť zvyšuje po chemickej indukcii pravdepodobnosť výskytu rakoviny žalúdka, kože, čriev alebo močového mechúra [17]. Takisto bolo dokázané, že jedinci so špecifickým SNP v promótorovej oblasti *NFE2L2* génu majú väčšie riziko výskytu nemalobunkového karcinómu pľúc spôsobené zrejme signifikantne zníženou hladinou *NFE2L2* mRNA [18,19]. Ochranný potenciál tejto dráhy pravdepodobne spočíva v jej schopnosti redukovat množstvo ROS a s tým súvisiaceho poškodenia DNA [20].

Nrf2 ako onkoproteín

Napriek pozitívnej asociácii antioxidantnej odpovede riadenej Nrf2 signálnou dráhou so zníženým rizikom vzniku nádorových ochorení môže mať jej dlhodobá aktivácia negatívny efekt. Konštitutívne zvýšená hladina Nrf2 bola detekovaná v nádoroch hlavy a krku, vaječníkov, prsníkov a pľúc a bola dokázaná aj jej spojitosť so zrýchlenou nádorovou progresiou [21–26]. Zhoršená prognóza liečby nádorov so zvýšenou hladinou Nrf2 je dôsledkom jej schopnosti podporovať proliferáciu a zvyšovať odolnosť na chemo- a rádioterapiu [21,25,27]. Tento jav je podporený viacerými štúdiami, podľa ktorých Nrf2 prispieva k vlastnej aj získanej chemorezistencii pravdepodobne skrz zvýšenie odolnosti na stres [21,25,26,28,29]. Keďže viacero Nrf2 indukovaných génov kóduje cytoprotektívne proteíny, akými sú NAD(P)H chinón oxidoreduktáza 1, hém oxygenáza 1, glutatión, glutatión-S-transferáza, potenciálnym mechanizmom môže byť zvýšená obrana bunky proti poškodeniu spôsobeného ROS, keďže ROS sú čiastočne generované pôsobením anti-neoplastických látok. Navyše proteíny ako GSH (redukovaná forma glutatiónu), ktoré obsahujú reaktívne tiolové skupiny, sa môžu viazať na elektrofilné medziprodukty metabolizmu antineoplastických látok a alkylačných činidiel a tak ich inaktivovať. Nádorové bunky so zvýšenou hladinou Nrf2 sú menej citlivé na často používané chemoterapeutiká,



Obr. 1. Regulácia signálnej dráhy Nrf2-Keap1.

Za bazálnych podmienok (A) väzba Keap1 na ETGE a DLG domény Nrf2 zabezpečí orientáciu oboch proteínov vhodnú k ubiquitinácii a po nej ich následne nasmeruje do proteazómu, kde sú potom degradované. Po modifikácii cysteínov spôsobenej oxidatívnym stresom alebo prítomnosťou xenobiótík (B) je Keap1 neschopný väzby na Nrf2, disociácia Cul3 z BTB domén Keap1 zase zabráni ubiquitinácii Nrf2-Keap1 komplexu (C). V oboch prípadoch je Nrf2 uvoľnený a translokovaný do jadra, kde spolu s Maf proteínmi vytvorí transkripčný komplex a riadi expresiu génov zapojených do odpovede na oxidatívny stres (D).

ako napr. cisplatinu, 5-fluorouracil, či doxorubicín. Po inhibícii expície Nrf2 pomocou siRNA sa ich rezistencia zase znížila [21,22,23,28,30–32]. Znížená alebo zvýšená expícia Nrf2 je v priamej korelácii s citlivosťou nádorových buniek na terapiu, čo je dôkazom jej dôležitosti vo vytvorení chemorezistencie. V nedávnej štúdii bola tiež ukázaná spojitost medzi zvýšenou hladinou Nrf2 v nádorových bunkách pľúcneho karcinómu A549 s ich schopnosťou proliferácie prostredníctvom aktivácie expície génov zodpovedných za regeneráciu NADPH (dihydronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate) [33]. Pomocou microarray analýzy bolo navyše identifikovaných viacero génov kontrolovaných Nrf2, ktoré sa zúčastňujú biosyntézy purínov – stavebných kameňov RNA a DNA a tiež proteínov zapojených v metabolizme glukózy [34]. Uvedené skutočnosti potvrdzujú hypotézu o onkogénnom potenciáli Nrf2, ktorý aktivuje viacero mechanizmov podporujúcich nádorovú progresiu a prežívanie.

Deregulácia signálnej dráhy Nrf2

Doposiaľ bolo popísaných niekoľko mechanizmov, ktorými nádorové bunky konštitutívne aktivujú signálnu dráhu Nrf2. Napríklad epigenetické utlmenie expície pomocou metylácie špecifických CpG miest v promótorovej oblasti Keap1 vedie k nedostatočnej represii Nrf2 vo viacerých typoch nádorov [26,35]. Modifikácia expície Keap1 je klinicky signifikantná, v pľúcnych karcinómoch a malígnych gliómoch bola asociovaná so zhoršenou prognózou liečby [35]. Zvýšenie hladiny Nrf2 môže byť indukované aj sprostredkovane aktiváciou onkoproteínov ako B-Raf, c-Myc, K-Ras [21,28,30,36–39], posttranslačnými modifikáciami cysteínov v Keap1, alebo nahromadením proteínov schopných rozrušiť komplex Nrf2-Keap1 [13,40–45].

Komunikácia Nrf2 s inými signálnymi dráhami

So zvýšenou aktivitou signálnej dráhy Nrf2 môže úzko súvisieť aj jej interakcia s inými signálnymi dráhami, ktoré sú počas malígnej transformácie často deregulované. Proteín p53 negatívne re-

guluje transkripciu cieľových génov Nrf2 ako napr. *GST1*, *NQO1* a *x-ct* [46]. Po kotransfekcii niekoľkých bunkových línií s vektormi obsahujúcimi kombináciu Nrf2 a p53 bola oproti transfekcii samotným Nrf2 pozorovaná znížená expícia jeho viacerých cieľových génov. Silná indukcia p53 tak môže zatiaľ nevysvetleným mechanizmom znížiť účinnosť antioxidantnej odpovede nádorových buniek a podporiť tak bunkovú smrť [34]. Na druhej strane je zaujímavé, že indukcia p21^{WAF1}, terčového proteínu p53, pomáha Nrf2 stabilizovať [47]. Deje sa tak pomocou väzby p21^{WAF1} na Nrf2, ktorá zabraňuje jeho naviazaniu na Keap1 a následnej ubikvitinácii Nrf2-Keap1 komplexu. Pri absencii p21^{WAF1} je bazálna a aj indukovateľná expícia génov regulovaných Nrf2 znížená.

Prostredníctvom interakcie proteínov Keap1 a p62 je signálna dráha Nrf2 veľmi úzko prepojená s procesom bunkovej autofágie. Priamym následkom nadmernej ektoptickej expície p62 alebo blokovania autofagického „toku“ je zníženie hladiny Keap1 prostredníctvom jeho väzby na p62, ktorý ho nasmeruje do autofagozómov. Tam dochádza k jeho degradácii, čo vedie k zvýšeniu stability Nrf2 a teda aj k vyššej expresii ním riadených génov [48–50]. Zvýšenie stability Nrf2 týmto spôsobom sa nazýva nekanonická aktivácia Nrf2, pretože jej mechanizmus nie je závislý od modifikácie cysteínov na Keap1, ale od expície p62. V myšiach, ktoré mali narušený proces autofágie bola zaznamenaná zvýšená akumulácia Nrf2, čo sa prejavilo poškodením pečene [50]. Naopak, použitie siRNA pre p62 zvýšilo hladinu a stabilitu Keap1 a nepriamo tak znížilo hladinu Nrf2 a expiciu jej cieľových génov [49,51]. Tieto experimenty potvrdzujú úzke spojenie aktivácie Nrf2 dráhy s procesom autofágie a dávajú nový pohľad na funkčné prepojenie jednotlivých mechanizmov, ktoré napomáhajú nádorovej bunke k prežitiu.

Inhibícia a modulácia Nrf2

Napriek negatívnej korelácii aktivity Nrf2 s úspešnosťou liečby je vývoj špecifických inhibítorov Nrf2 problematický, najmä kvôli jeho štruktúrnej podobnosti s inými transkripčnými faktormi

z bZip rodiny. Z dostupných možností vychádzajúcich zo súčasných poznatkov sa tak ponúka využitie Nrf2 siRNA [52] či PI3K inhibítorov [33] a v neposlednom rade i prírodných látok so známou schopnosťou modulácie Nrf2 dráhy [53]. Nádejou by mohla byť aj alternatívna terapia lentivírusovými vektormi, ktoré obsahujú gén konvertujúci neškodné predliečivo na toxickú látku. Pri zaradení tohto génu za ARE miesta s vysokou väzbovou aktivitou Nrf2 by tak dochádzalo k efektívnemu zničeniu nielen nádorových buniek, ale aj okolitého nádorového mikroprostredia [54,55]. V budúcnosti by sa tiež dali využiť vedomosti o interakcii Nrf2 s inými signálnymi dráhami a využiť potenciál iných, lepšie modulovateľných cieľov. V tomto bode je zaujímavé spomenúť DMF (dimetyl fumarát), ktorý sa v klinickej praxi používa pri liečbe psoriázy, roztrúsenej sklerózy a iných autoimunitných ochorení [56–61]. Mechanizmus jeho účinku nebol doposiaľ úplne vysvetlený, no bolo potvrdené, že sa viaže na redukovanú formu glutatiónu a jeho metabolit monometyl fumarát je potentným aktivátorom Nrf2 signálnej dráhy [62,63]. Uvažuje sa dokonca aj o jeho využití pri liečbe nádorových ochorení. V literatúre bola popísaná jeho schopnosť inhibovať rast a metastázovanie na myšom modeli melanómu a bunkách derivovaných z pacientov s glioblastómom [64–66]. Tento fenomén je nesporné zaujímavý, keďže súčasťou účinku DMF je aktivácia Nrf2 dráhy, ktorá je u nádorov spájaná práve so zvýšenou proliferáciou a zrýchlenou progresiou. Poznatky získané s DMF naznačujú, že výsledok aktivácie Nrf2 dráhy je závislý aj od kontextu iných dejov a zasluhuje si ďalšie skúmanie.

Zhrnutie

Niekoľko štúdií uvedených v tomto prehľadnom článku potvrdilo schopnosť Nrf2 signálnej dráhy chrániť bunky zdravého tkaniva pred xenobiotikami alebo oxidačným stresom, ktorý môže potenciálne viesť k malígnej transformácii. Na druhej strane bola pozorovaná korelácia zvýšenia hladiny Nrf2 so zhoršenou prognózou liečby u viacerých typov nádorových ochorení. Otázkou zostáva, či sa aktivácia Nrf2 podieľa na vzniku ná-

dorového ochorenia, alebo vzniká len sekundárne ako súčasť „malígneho fenotypu“. Za aktiváciu Nrf2 v nádoroch by tiež mohla byť zodpovedná jej interakcia s inými signálnymi dráhami, ktoré sú v nádoroch často deregulované. Potlačenie nadmernej aktivácie tejto signálnej dráhy by tak mohlo byť sprostredkované moduláciou signálnych dráh, ktoré s ňou priamo interagujú, alebo pomocou špecifických inhibítorov Nrf2. Tie sa však zatiaľ nachádzajú len vo fáze vývoja. Odpovede by mohla priniesť podrobnejšia analýza DMF vo vzťahu k nádorovým ochoreniam, ktorý sa v klinickej praxi zväčša používa pri liečbe autoimunitných ochorení. Napriek jeho vlastnosti aktivátora Nrf2 dráhy bola na experimentálnych modeloch pozorovaná jeho schopnosť inhibovať rast nádoru. Možné využitie DMF v onkologickej liečbe poukazuje na to, že modulácia Nrf2 signálnej dráhy je zaujímavá nielen z hľadiska výskumu, ale lepšie poznanie jej chemopreventívnych účinkov a fenoménu liekovej rezistencie má aj klinický potenciál.

Literatúra

- Zhang DD, Lo SC, Cross JV et al. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol* 2004; 24(24): 10941–10953. doi: 10.1128/MCB.24.24.10941-10953.2004.
- McMahon M, Thomas N, Itoh K et al. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 domain and the redox-insensitive Neh6 domain. *J Biol Chem* 2004; 279(30): 31556–31567.
- Tong KI, Kobayashi A, Katsuoka F et al. Two site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol Chem* 2006; 387(10–11): 1311–1320.
- Kobayashi A, Kang MI, Okawa H et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 2004; 24(16): 7130–7139.
- Moi P, Chan K, Asunis I et al. Isolation of NFE2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(21): 9926–9930.
- Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ et al. The carboxyterminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 2005; 25(24): 10895–10906.
- Katoh Y, Itoh K, Yoshida E et al. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* 2001; 6(10): 857–868.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999; 13(1): 76–86.
- Lo SC, Li X, Henzl MT et al. Structure of the Keap1-Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J* 2006; 25(15): 3605–3617.
- McMahon M, Thomas N, Itoh K et al. 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. *J Biol Chem* 2006; 281(34): 24756–24768.
- Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A et al. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol Cell Biol* 2007; 27(21): 7511–7521.
- Villeneuve NF, Tian W, Wu T et al. USP15 negatively regulates Nrf2 through deubiquitination of Keap1. *Mol Cell* 2013; 51(1): 68–79. doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.022.
- Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* 2011; 16(2): 123–140. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x.
- Kansanen E, Jyrkkanen HK, Levenon AL. Activation of stress signalling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(6): 973–982. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.038.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 89–116.
- Lau A, Villeneuve NF, Sun Z et al. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res* 2008; 58(5–6): 262–270. doi: 10.1016/j.phrs.2008.09.003.
- Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(6): 3410–3415.
- Yamamoto T, Yoh K, Kobayashi A et al. Identification of polymorphisms in the promoter region of the human NRF2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321(1): 72–79.
- Suzuki T, Shibata T, Takaya K et al. Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol Cell Biol* 2013; 33(12): 2402–2412. doi: 10.1128/MCB.00065-13.
- Morito N, Yoh K, Itoh K et al. Nrf2 regulates the sensitivity of death receptor signals by affecting intracellular glutathione levels. *Oncogene* 2003; 22(58): 9275–9281.
- Shibata T, Ohta T, Tong KI et al. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(36): 13568–13573. doi: 10.1073/pnas.0806268105.
- Wang XJ, Sun Z, Villeneuve NF et al. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 2008; 29(6): 1235–1243. doi: 10.1093/carcin/bgn095.
- Jiang T, Chen N, Zhao F et al. High levels of Nrf2 determine chemoresistance in type II endometrial cancer. *Cancer Res* 2010; 70(13): 5486–5496. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0713.
- Kim YR, Oh JE, Kim MS et al. Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J Pathol* 2010; 220(4): 446–451. doi: 10.1002/path.2653.
- Solis LM, Behrens C, Dong W et al. Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3743–3753. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3352.
- Zhang P, Singh A, Yegnasubramanian S et al. Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(2): 336–346. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0589.
- Sasaki H, Suzuki A, Shitara M et al. Genotype analysis of the NRF2 gene mutation in lung cancer. *Int J Mol Med* 2012; 31(5): 1135–1138. doi: 10.3892/ijmm.2013.1324.
- Singh A, Misra V, Thimmulappa RK et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small cell lung cancer. *PLoS Med* 2006; 3(10): e420.
- Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y et al. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2012; 103(4): 760–766. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02216.x.
- Ohta T, Iijima K, Miyamoto M et al. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res* 2008; 68(5): 1303–1309. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5003.
- Homma S, Ishii Y, Morishima Y et al. Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(10): 3423–3432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2822.
- Lister A, Nedjadi T, Kitteringham NR et al. Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy. *Mol Cancer* 2011; 10: 37. doi: 10.1186/1476-4598-10-37.
- Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 2012; 22(1): 66–79. doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.016.
- Jaramillo MC, Zhang DD. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev* 2013; 27(20): 2179–2191. doi: 10.1101/gad.225680.113.
- Muscarella LA, Parrella P, D'Alessandro V et al. Frequent epigenetics inactivation of KEAP1 gene in non-small cell lung cancer. *Epigenetics* 2011; 6(6): 710–719.
- Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T et al. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell* 2006; 21(5): 689–700.
- Nioi P, Nguyen T. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362(4): 816–821.
- Ooi A, Dykema K, Ansari A et al. CUL3 and NRF2 mutations confer an NRF2 activation phenotype in a sporadic form of papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2013; 73(7): 2044–2051. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3227.
- Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2013; 45(8): 860–867. doi: 10.1038/ng.2699.
- Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(8): 564–571. doi: 10.1038/nrc3278.
- DeNicola GM, Karreth FA, Humpston TJ et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 2011; 475(7354): 106–109. doi: 10.1038/nature10189.
- Hanada N, Takahata T, Zhou Q et al. Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer* 2012; 12: 66. doi: 10.1186/1471-2407-12-66.
- Adam J, Hatipoglu E, O'Flaherty L et al. Renal cyst formation in Fh1-deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway: roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer Cell* 2011; 20(4): 524–537. doi: 10.1016/j.ccr.2011.09.006.
- Ooi A, Wong JC, Pettillo D et al. An antioxidant response phenotype shared between hereditary and sporadic type 2 papillary renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2011; 20(4): 511–523. doi: 10.1016/j.ccr.2011.08.024.
- Ma Q, He X. Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: promises and perils of nrf2. *Pharmacol Rev* 2012; 64(4): 1055–1081. doi: 10.1124/pr.110.004333.
- Faraonio R, Vergara P, Di Marzo D et al. p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. *J Biol Chem* 2006; 281(52): 39776–39784.
- Chen W, Sun Z, Wang XJ et al. Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Cell* 2009; 34(6): 663–673. doi: 10.1016/j.molcel.2009.04.029.
- Komatsu, Kurokawa H, Waguri S et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* 2010; 12(3): 213–223. doi: 10.1038/ncb2021.
- Lau A, Wang XJ, Zhao F et al. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol* 2010; 30(13): 3275–3285. doi: 10.1128/MCB.00248-10.
- Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M et al. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox

- homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(34): 13561–13566. doi: 10.1073/pnas.1121572109.
51. Copple IM, Lister A, Obeng AD et al. Physical and functional interaction of sequestosome 1 with Keap1 regulates the Keap1-Nrf2 cell defense pathway. *J Biol Chem* 2010; 285(22): 16782–16788. doi: 10.1074/jbc.M109.096545.
52. Singh A, Boldin-Adamsky S, Thimmulappa RK et al. RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer Res* 2008; 68(19): 7975–7984. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1401.
53. Ren D, Villeneuve NF, Jiang T et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(4): 1433–1438. doi: 10.1073/pnas.1014275108.
54. Hurttila H, Koponen JK, Kansanen E et al. Oxidative stress-inducible lentiviral vectors for gene therapy. *Gene Ther* 2008; 15(18): 1271–1279. doi: 10.1038/gt.2008.75.
55. Leinonen HM, Ruotsalainen AK, Määttä AM. Oxidative stress-regulated lentiviral TK/GCV gene therapy for lung cancer treatment. *Cancer Res* 2012; 72(23): 6227–6235. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1166.
56. Nicholas JA, Boster AL, Imitola J et al. Design of oral agents for the management of multiple sclerosis: benefit and risk assessment for dimethyl fumarate. *Drug Des Devel Ther* 2014; 8: 897–908. doi: 10.2147/DDDT.S50962.
57. Bompreszi R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an overview. *Ther Adv Neurol Disord* 2015; 8(1): 20–30. doi: 10.1177/1756285614564152.
58. Gill AJ, Kolson DL. Dimethyl fumarate modulation of immune and antioxidant responses: application to HIV therapy. *Crit Rev Immunol* 2013; 33(4): 307–359.
59. Oh CJ, Kim JY, Choi YK et al. Dimethylfumarate attenuates renal fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor- β /Smad signaling. *PLoS One* 2012; 7(10): e45870. doi: 10.1371/journal.pone.0045870.
60. Ashrafian H, Czibik G, Bellahcene M et al. Fumarate is cardioprotective via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Cell Metab* 2012; 15(3): 361–371. doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.017.
61. Belge K, Brück J, Ghoreschi K. Advances in treating psoriasis. *F1000Prime Rep* 2014; 6: 4. doi: 10.12703/P6-4.
62. Brennan MS, Matos MF, Bing Li et al. Dimethyl fumarate and monoethyl fumarate exhibit differential effects on KEAP1, NRF2 activation, and glutathione depletion in vitro. *PLoS One* 2015; 10(3): e0120254. doi: 10.1371/journal.pone.0120254.
63. Takaya K, Suzuki T, Motohashi H et al. Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med* 2012; 53(4): 817–827. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.023.
64. Odom RY, Dansby MY, Rollins-Hairston AM et al. Phytochemical induction of cell cycle arrest by glutathione oxidation and reversal by N-acetylcysteine in human colon carcinoma cells. *Nutr Cancer* 2009; 61(3): 332–329. doi: 10.1080/01635580802549982.
65. Loewe R, Valero T, Kremling S et al. Dimethylfumarate impairs melanoma growth and metastasis. *Cancer Res* 2006; 66(24): 11888–11896.
66. Ghods AJ, Glick R, Braun D et al. Beneficial actions of the anti-inflammatory dimethyl fumarate in glioblastomas. *Surg Neurol Int* 2013; 4: 160. doi: 10.4103/2152-7806.123656.