

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Tereza Tichá

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Úloha Nrf2 v metabolismu glutathionu a buněčné smrti
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza Tichá**
Osobní číslo: **C20272**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Úloha Nrf2 v metabolismu glutathionu a buněčné smrti**
Téma práce anglicky: **Role Of Nrf2 In Glutathione Metabolism And Cell Death**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerži o Nrf2 a jeho úloze v metabolismu glutathionu. V úvodní části se zaměřte na glutathion, popište podrobně jeho strukturu a metabolismus.
- 2) V hlavní části bakalářské práce se poté věnujte především transkripčnímu faktoru Nrf2, popisu jeho struktury a hlavních funkcí. Uvedte jeho konkrétní role v metabolismu glutathionu a buněčné smrti.
- 3) Pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce čerpejte z odborných článků publikovaných v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Pavlína Nývltová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Jan Čapek, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem „**Úloha Nrf2 v metabolismu glutathionu a buněčné smrti**“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 17. 6. 2023

Tereza Tichá

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Pavlíně Nývtové, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, za všechny cenné rady, připomínky a hlavně za všechny čas, který mi během psaní věnovala. Stejně tak děkuji i Mgr. Janu Čapkovi, Ph.D., mému konzultantovi, za všechny návrhy a podněty, které během konzultací vznesl. Mé poděkování patří také mé rodině, která mi pomáhala během celého studia, a mému příteli, který mi byl oporou v těžkých chvílích.

ANOTACE

Úvodní část této bakalářské práce je zaměřena na strukturu a hlavní funkce glutathionu. V hlavní části práce je popsána struktura a funkce transkripčního faktoru Nrf2. Jeho hlavní funkce popsána v této práci se týká metabolismu glutathionu, kde se účastní jeho syntézy a indukuje aktivitu důležitých enzymů, jako je glutathion reduktáza a glutathion S-transferáza. Dále je popsána jeho funkce v buňce během oxidačního stresu, zánětu, ale také v buněčné smrti.

KLÍČOVÁ SLOVA

glutathion, oxidační stres, Nrf2, buněčná smrt, apoptóza

TITLE

Role Of Nrf2 In Glutathione Metabolism And Cell Death

ANNOTATION

The introductory part of this bachelor's thesis is focused on the structure and main functions of glutathione. In the main part of the thesis, the structure and functions of the transcription factor Nrf2 are described. Its main function described in this work relates to glutathione metabolism, where it participates in its synthesis and induces the activity of important enzymes such as glutathione reductase and glutathione S-transferase. Furthermore, its function in the cell during oxidative stress, inflammation, as well as cell death, is described.

KEYWORDS

glutathione, oxidative stress, Nrf2, cell death, apoptosis

Obsah

Úvod.....	15
1 Glutathion	16
1.1 Struktura glutathionu.....	16
1.2 Glutathionový systém.....	17
1.2.1 Glutathionový cyklus.....	17
1.2.2 Transport glutathionu do buňky.....	19
1.2.3 Regulace glutamát-cystein ligázy a glutathion syntetázy	19
1.2.4 Enzymy glutathionového systému	20
1.3 Funkce glutathionu.....	21
1.3.1 Funkce glutathionu v apoptóze	22
2 Nukleární erytroidní faktor 2	24
2.1 Transkripční faktory.....	24
2.1.1 Struktura transkripčních faktorů	24
2.1.2 Mechanismus působení.....	27
2.2 Struktura Nrf2	28
2.2.1 sMAF a Bach1	28
2.3 Systém Keap1-Nrf2 v buňce	29
2.4 Regulace aktivity Nrf2	30
2.4.1 Rozpad Nrf2-Keap1	30
2.4.2 Regulace na transkripční úrovni	31
2.4.3 Regulace na post-transkripční úrovni	32
3 Úloha Nrf2 v buňce.....	33
3.1 Role v zánětlivé reakci	35
3.1.1 Systém Nrf2/HO-1	35
3.1.2 Interakce se zánětlivými mediátory	36
3.1.3 Nrf2 v regulaci adhezivních molekul.....	36

3.1.4	Nrf2-dependentní protizánětlivé léky	37
3.2	Nrf2 a glutathion	38
3.3	Úloha Nrf2 v neurodegenerativním onemocnění	39
3.3.1	Alzheimerova choroba	41
3.3.2	Parkinsonova choroba	43
3.3.3	Interakce mTOR a Nrf2	45
3.4	Úloha Nrf2 v reparaci tkání	47
4	Úloha Nrf2 v buněčné smrti	50
4.1	Detoxikační enzymy	50
4.1.1	Stopové prvky	50
4.2	Ferroptóza	51
4.2.1	Funkce Nrf2 v ferroptóze	53
4.3	Apoptóza	54
4.3.1	Funkce Nrf2 v apoptóze	54
4.3.2	PERK-dependentní aktivace Nrf2	55
	Závěr	57
	Použitá literatura	58

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK:

Obrázek 1: Struktura glutathionu v redukované a oxidované formě	16
Obrázek 2: Syntéza glutathionu	17
Obrázek 3: Glutathionový cyklus.....	18
Obrázek 4: Redoxní pufrovací reakce glutathionového systému.....	21
Obrázek 5: Struktura zinkového prstu.....	25
Obrázek 6: Struktura leucinového zipu	26
Obrázek 7: Struktura Helix-turn-helix (vlevo) a Helix-loop-helix (vpravo).....	26
Obrázek 8: Mechanismus působení transkripčních faktorů	27
Obrázek 9: Doménová reprezentace Nrf2, Keap1, sMAF a Bach1	30
Obrázek 10: Regulace Nrf2 v mitochondrii	34
Obrázek 11: Vliv oxidačního stresu	41
Obrázek 12: Role Nrf2 v Alzheimerově chorobě.....	43
Obrázek 13: Schéma struktury mTORC1 a mTORC2.....	46
Obrázek 14: Buněčné procesy regulované Nrf2	49
Obrázek 15: Ferroptóza	52
Obrázek 16: Cílové geny Nrf2 zahrnuté ve ferroptóze	53
Tabulka 1: Nrf2-dependentní protizánětlivé léky	38
Tabulka 2: Aktivátory Nrf2 testované pro léčbu Parkinsonovy choroby.....	44

SEZNAM ZKRATEK

4HNE	4-hydroxy-2-nonenal
AD	Alzheimerova choroba
ADP	adenosindifosfát
Ahr	aryl hydrokarbonový receptor
Akt	protein kináza B
AMK	aminokyselina
APP	amyloidní prekurzorový protein
ARE	antioxidační responzivní element
ART	zesilovač regenerace jater
ASA	acetylsalicylová kyselina
ASN	α -synuklein
ATF4	aktivační translační faktor 4
ATP	adenosintrifosfát
A β	amyloidní β peptid
BAP1	BRCA1-asociovaný protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRCA1	gen náchylnosti k rakovině prsu
bZIP	základní leucinový zip
CAM	buněčné adhezivní molekuly
Cdk5	cyklin-dependentní kináza 5
CK-MB	kreatinkináza MB
CNC	Cap ,n‘ Collar
CNS	centrální nervová soustava
COX-2	cyklooxygenáza 2
CUL3	Cullin 3
DAMP	molekulární vzory asociované s poškozením
DEP	Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin
Deptor	DEP-interagující s mTOR
DLG	Disc Large
DMF	dimethylfumarát

DNA	deoxyribonukleová kyselina
EAAC1	excitační nosič AMK 1
eIF2	eukaryotický translační iniciační faktor 2
ER	endoplazmatické retikulum
ETGE	motiv AMK zbytků glutamát-threonin-glycin-glutamát
FAD	flavinadenindinukleotid
G6PD	glukózo-6-fosfát dehydrogenáza
GCL	γ -glutamátcysteinligáza
GCLC	katalytická podjednotka GCL
GCLM	modifikační podjednotka GCL
GGT	γ -glutamyltranspeptidáza
GPx	glutathion peroxidáza
GR	glutathion reduktáza
GRP78	glukózou-regulovaný protein 78
GS	glutathion syntetáza
GSH	redukovaná forma glutathionu
GSK-3 β	glykogen syntáza kináza 3
GSSG	disulfidová oxidovaná forma glutathionu
GST	glutathion-S-transferáza
HLH	spirála-smyčka-spirála
HO-1	hemoxygenáza 1
HTH	spirála-otočka-spirála
Chil3	chitináza-like 3
CHOP	C/EBP homologní protein
ICAM-1	intracelulární adhezivní molekuly 1
IL	interleukin
IR	ischemická hyperfúze
IRE	inositol vyžadující enzym
IRS	substrát inzulinového receptoru
I κ B	inhibitor κ B
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LDH	laktátdehydrogenáza

LPS	lipopolysacharid
Maf	proteiny muskuloaponeurotického fibrosarkomu
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinová kináza
MARE	Maf-rozpoznávající element
mLST8	podjednotka smrtící pro savce s sec13 proteinem 8
mRNA	microRNA
mSin1	savčí stresem-aktivovaná proteinkináza 1
mtDNA	mitochondriální DNA
mTOR	savčí cíl rapamycinu
mTORC	komplex mTOR
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NDP52	nukleární dot protein 52
NF- κ B	nukleární faktor κ B
NROB2	nukleární receptor rodiny 0 skupiny B
NSAID	nesteroidní protizánětlivé léky
PAMP	s patogenem asociované molekulové vzory
PD	Parkinsonova choroba
PDK1	3-fosfoinositid-dependentní proteinkináza 1
PERK	protein kináza-like ER kináza
PGAM5	fosfoglycerátmutáza
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PINK 1	PTEIN-indukovaná proteinkináza 1
PIP	fosfatidylinositolfosfát
PKB	protein kináza B
PMI	induktor mitofagie zprostředkovaný p62
PPAR γ	peroxizomovým proliferátorem aktivovaný receptor γ
PRAS40	na prolin bohatý Akt substrát
PRDX1	peroxiredoxin 1
Protor	protein pozorovaný s Rictor
PRR	receptory rozpoznávající molekulové vzory
PTEN	homolog fosfatázy a tenzinu
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny

Raptor	s regulátorem asociovaný protein mTOR
RELM- α	Resistin-like molekula α
Rictor	na rapamycinu-necitlivý společník mTOR
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAD	steroidní protizánětlivé léky
sMaf	malé proteiny muskuloaponeurotického fibrosarkomu
SQSMT1	sekvestozom 1
TCDD	2,3,7,8-tetrachloridbenzo-p-dioxin
TF	transkripční faktor
TFIID	transkripční faktor II D
TFIIIB	transkripční faktor III B
TH	pomocný T lymfocyt
TLR	Toll-like receptory
TNFR-1	receptor tumor nekrotizujícího faktoru 1
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
Trx	thioredoxin
TrxR	thioredoxin reduktáza
TSC2	protein tuberózní sklerózy
TXNRD1	thioredoxinreduktáza 1
UBE2E3	ubikvitin-konjugující enzym E2 E3
UPR	unfolded protein response
VAM-1	vaskulární adhezivní molekuly 1
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
xCT	transportér cystein-glutamát
XRE	xenobiotický responzivní element

Úvod

Nrf2 je transkripční faktor, který má klíčovou roli v buněčné ochraně proti oxidačnímu stresu a v udržování redoxní rovnováhy. Když je buňka vystavena oxidačnímu stresu, může dojít k aktivaci Nrf2 a jeho přesunu do jádra, kde aktivuje řadu genů, které jsou zahrnuty v obranných mechanismech buňky. Je součástí řady dalších biologických procesů včetně zánětu, metabolismu xenobiotik a buněčného přežití. Nrf2 je dále úzce spojen s glutathionem. Zatímco glutathion působí jako důležitá antioxidační molekula, Nrf2 reguluje expresi genů zahrnutých v metabolismu glutathionu, čímž zajišťuje účinnou buněčnou antioxidační odpověď. Spolupráce těchto dvou molekul je nezbytná pro udržení redoxní rovnováhy a ochrany před oxidačním poškozením. V neposlední řadě je Nrf2 pro své cytoprotektivní a antioxidační vlastnosti součástí také regulace buněčné smrti a propojení Nrf2 s různými signálními dráhami může ovlivnit konečný osud buňky.

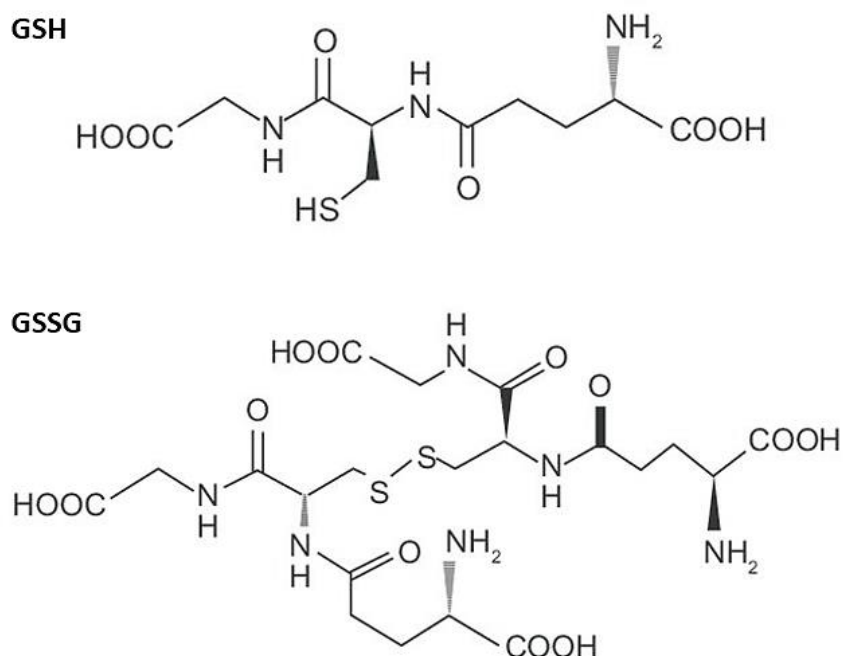
Cílem této bakalářské práce je popis funkce transkripčního faktoru Nrf2, se zaměřením na jeho roli v metabolismu významného antioxidantu glutathionu a buněčné smrti.

1 Glutathion

Glutathion, známý také jako γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin, je tripeptid patřící mezi nejdůležitější antioxidanty nízké molekulové hmotnosti syntetizovaných v buňce. Thiolová skupina -SH převzatá z cysteinu je zahrnuta v řadě konjugačních a redukčních reakcích, které se podílejí na odstraňování peroxidů a xenobiotických sloučenin, a je tak důležitou funkční částí glutathionu. Ten hraje také roli v odstraňování radikálů a je součástí regulace buněčné smrti [1].

1.1 Struktura glutathionu

Glutathion je tripeptid skládající se ze tří aminokyselin (AMK): cysteinu, kyseliny glutamové a glycinu. Kyselina glutamová je připojená na N-konec cysteinglycinu. Thiolová skupina získaná z cysteinu jej činí výrazným antioxidantem. Glutathion se může vyskytovat ve dvou volných formách – redukované thiolové (GSH) a oxidované disulfidové formě (GSSG), viz. obr. 1, přičemž více než 98 % celkového glutathionu se vyskytuje ve formě redukované. Glutathion může dále reagovat s jinými thiolovými sloučeninami a měnit tak jejich aktivitu. Obě formy se vyskytují v buňkách savců v koncentracích od 1 do 10 mM [2, 3].



Obrázek 1: Struktura glutathionu v redukované a oxidované formě. GSH – redukovaný glutathion, GSSG – oxidovaný glutathion. Převzato z: [4].

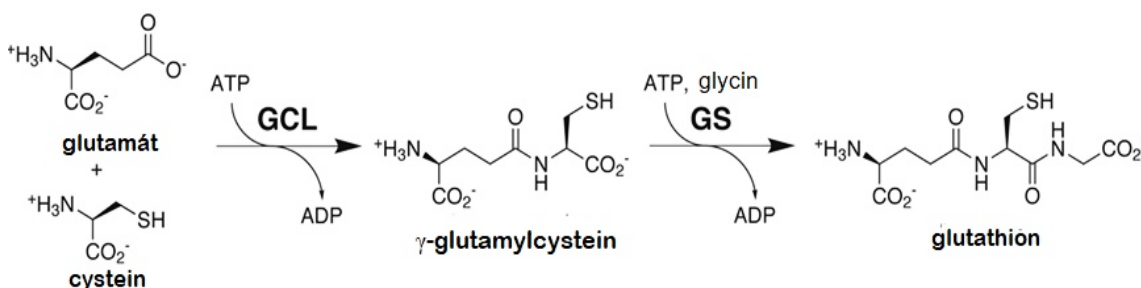
1.2 Glutathionový systém

Glutathionový systém je jedním z klíčových regulátorů buněčné redoxní rovnováhy. Skládá se z γ -glutamát-cystein ligázy (GCL), glutathion syntetázy (GS), GSH a GSSG, glutathion peroxidázy (GPx), glutathion reduktázy (GR), glutathion-S-transferázy (GST) a nikotinamidadeninindinukleotidfosfátu (NADPH). GSH je všudypřítomně distribuován v buňce a jeho dostupnost závisí na jeho syntéze, recyklaci GSSG enzymem GR a NADPH a na jeho detoxikační aktivitě pomocí GSH-zprostředkované konjugace s dalšími molekulami [5].

1.2.1 Glutathionový cyklus

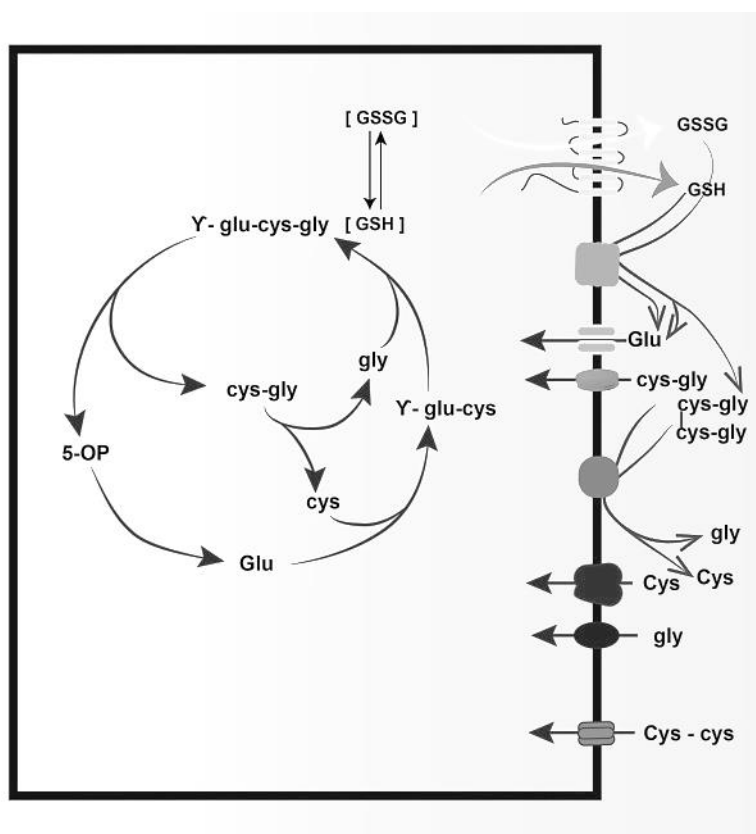
Glutathionový cyklus je cyklus reakcí, kterými prochází GSH v buňce. Tyto reakce zahrnují jeho vlastní syntézu, hydrolyzu za vzniku AMK, reakce GSH mimo cytosol a reakce vedoucí k resyntéze GSH.

Prvním krokem glutathionového cyklu je adice glutamátu a cysteinu pomocí enzymu GCL, čímž vzniká dipeptid γ -glutamylcystein. Poté následuje druhý krok, při kterém dochází k adici glycinu pomocí enzymu GS a vzniká glutathion. Oba tyto kroky vyžadují přítomnost adenosintrifosfátu (ATP) a jsou znázorněny na obr. 2. Za fyziologických podmínek je aktivita GCL regulována ne-allosterickou kompetitivní inhibicí glutathionem a dostupností L-cysteinu. Produkt prvního kroku, γ -glutamylcystein, je přítomen v extrémně nízkých koncentracích, a proto je GCL v přítomnosti GS považována za rychlost limitující enzym. Zvýšená aktivita GS tedy nijak neovlivňuje množství GSH, zatímco zvýšená aktivita GCL hladinu GSH zvyšuje [6].



Obrázek 2: Syntéza glutathionu. GSH – redukovaný glutathion, GSSG – oxidovaný glutathion, ATP – adenosintrifosfát, ADP – adenosindifosfát, GCL - γ -glutamylcystein ligáza, GS – glutathion syntetáza. Převzato z: [7].

Vzniklý glutathion je v redukované formě, která může být oxidována, a vzájemný poměr těchto dvou forem pak vyrovnává redoxní prostředí. Oxidovaná forma může být pomocí efluxu čerpána mimo cytosol specifickými transportéry během oxidativního či xenobiotického stresového působení. GSH je dále degradován specifickými γ -glutamylcyklotransferázami, dochází k hydrolyze a vzniká 5-oxoprolin s cysteinglycinem (Cys-Gly). Vzniklý 5-oxoprolin je dále štěpen oxoprolinázou za vzniku glutamátu a Cys-Gly je štěpen specifickými peptidázami na cystein a glycin. V případě potřeby mohou být vzniklé jednotky (cystein, glycin a glutamát) znovu použity pro intracelulární syntézu. GSH, který byl efluxem čerpán mimo cytosol může být zachycen membránovými γ -glutamyltransferázami a přeměněn na glutamát a Cys-Gly nebo bis-Cys-Gly. Glutamát i Cys-Gly mohou být zpětně transportovány dovnitř cytosolu, případně dochází k rozkladu na cystein (cystin) a glycin. Tyto složky mohou být také pomocí specifických transportérů vráceny zpět. Celý glutathionový cyklus znázorňuje obr. 3 [8].



Obrázek 3: Glutathionový cyklus. GSH – redukovaný glutathion, GSSG – oxidovaný glutathion, Cys – cystein, Gly – glycin, 5-OP – 5-oxoprolin, Glu – kyselina glutamová
Převzato z: [8].

1.2.2 Transport glutathionu do buňky

Transport GSH do buňky je spojován s aktivitou enzymu γ -glutamyltranspeptidázy (GGT), který se vyskytuje na buněčném povrchu. Vazba mezi γ -karboxylovou skupinou glutaminu a cysteinem neumožňuje štěpení pomocí peptidáz vyskytujících se volně v cirkulaci či intracelulárně, a proto je GSH hydrolyzován pomocí GGT na glutamát a cysteinglycin, který může být dále štěpen membránovými di-peptidázami a nebo intracelulárními Cys-Gly peptidázami. Vzniklé jednotky (cystein, glycin a glutamát) poté slouží jako prekurzory pro intracelulární syntézu GSH. V buňce se vyskytují tři rezervoáry glutathionu: největší podíl GSH se nachází v cytosolu, menší množství nalezneme v mitochondriích a nejméně v endoplasmatickém retikulu. Syntéza GSH probíhá pouze v cytosolu a hotovost v mitochondriích je udržována pomocí GSH transportu mitochondriálními poriny a aktivitou GR, která redukuje oxidovanou formu [3].

1.2.3 Regulace glutamát-cystein ligázy a glutathion syntetázy

GCL je heterodimer skládající se ze dvou podjednotek. První větší katalytická podjednotka (GCLC) je zodpovědná za vazbu mezi amino skupinou cysteinu a γ -karboxylovou skupinou glutamátu, a druhá menší modifikační podjednotka (GCLM) přímo působí na GCLC a zvyšuje její katalytickou aktivitu. GCLM také snižuje Michaelisovu konstantu K_M pro glutamát a ATP a zvyšuje inhibiční konstantu K_i pro inhibici glutathionu. Hladina GCL je regulována na transkripční i post-transkripční úrovni jako odpověď na oxidační stres buňky. Ačkoliv je GCLC zodpovědná za GCL aktivitu, zvýšení GCLM se zdá být efektivnějším mechanismem pro zvýšení GCL a to pro jeho limitní vlastnost k tvorbě holoenzymu GCL. Inhibice probíhá vlivem glutathionu, který soutěží o aktivní místo GCL s glutamátem. Další možností regulace jsou post-transkripční modifikace již existujících proteinů obou podjednotek, lehce toxická koncentrace určitých látek (např. H_2O_2), či oxidační stres. Obecně lze říci, že aktivita GCL může být regulována oxidačními podmínkami stimulaujícími jeho aktivitu, či redukčními podmínkami, které jeho aktivitu inhibují [9].

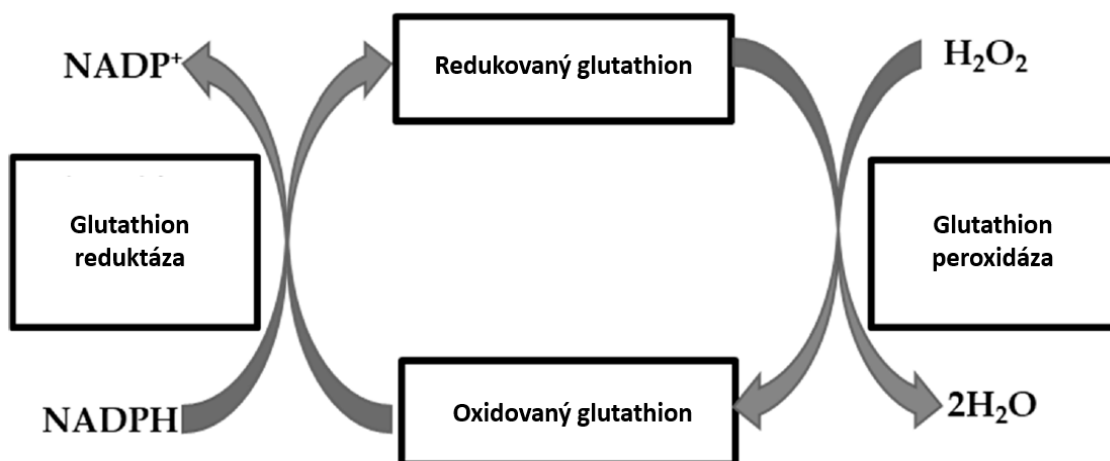
GS je tvořen ze dvou identických částí a není ovlivňován zpětnou inhibicí glutathionem. V momentě nedostatku GS dochází k akumulaci γ -glutamylcysteinu a ten je dále přeměňován na 5-oxoprolin. To může vyústit v těžkou metabolickou acidózu, poškození centrálního nervového systému, či hemolytickou anémii. Aktivita GS je

v játrech fyziologicky 2 až 4krát vyšší než GCL, nemusí tomu tak ale být v jiných tkáních či během stresového působení. Ačkoliv je GCL rychlost-limitujícím enzymem syntézy glutathionu, pokud se aktivita GS výrazně sníží, přebírá tuto „rolí“ a jeho regulace se stává důležitým aspektem z pohledu celé syntézy [6].

1.2.4 Enzymy glutathionového systému

Organismy, které využívají glutathion pro redoxní homeostázu, mají také schopnost syntetizovat GSH a dále jej recyklovat. Enzym GR je esenciálním enzymem glutathionového systému, který je schopen recyklovat GSSG zpět na GSH. Obsahuje dvě domény Rossmanova záhybu, kdy jedna váže flavinadenin dinukleotid (FAD) a NADPH a druhá je dimerizační doménou. GR se v buňce vyskytuje v jádře mitochondriích a endoplazmatickém retikulu (ER), přičemž k akumulaci dochází v oblastech s vysokým elektronovým tokem, kde také dochází ke generaci ROS. Mechanismus funkce GR je spojován s oddělením NADPH- a GSSG- vazebného místa a zahrnuje oxidační a redukční půl reakce. Nejdříve dochází k redukci enzymu pomocí NADPH, poté dochází k přesunu elektronů k GSSG, čímž dojde k regeneraci oxidovaného enzymu. Ačkoliv je role GR v metabolismu glutathionu důležitá, jediné zaznamenané klinické symptomy jeho nedostatku jsou zvýšená citlivost erytrocytů k oxidační zátěži a vývoj katarakty během brzké dospělosti [10].

Dalším enzymem, který je součástí glutathionového systému je GPx. GPx jsou obecně enzymy katalyzující redukci peroxidů na vodu nebo příslušné alkoholy pomocí GSH, který se chová jako elektronový dárce. U savců jsou čtyři hlavní selen-dependentní izoenzymy GPx: GPx1 (nacházející se např. v červených krvinkách), GPx2 (gastrointestinální), GPx3 (plazmatický) a GPx4 (fosfolipidový). Enzymy GPx a GR jsou významnými prvky redoxní nárazníkové funkce glutathionu, viz. obr. 4. Jejich reakce totiž udržují vzájemný poměr GSH/GSSG, který odráží redoxní kapacitu buňky. Vlivem reaktivních forem kyslíku (ROS) a reaktivních forem dusíku (RNS) pak dochází ke snížení GSH, změně tohoto poměru, a to může vést k apoptóze a nekróze [11, 12].



Obrázek 4: Redoxní pufrovací reakce glutathionového systému. NADP⁺ a NADPH – redukovaná a oxidovaná forma nikotinamidadeninindinukleotidfosfátu. Převzato z: [13].

GST jsou multifunkčními enzymy, které katalyzují útok nukleofilu GSH. To vede ke konjugaci GSH s elektrofilny, nebo hydrofobními molekulami pro tvorbu více rozpustných peptidových derivátů. Jejich hlavní funkcí je detoxikace řady xenobiotiky pomocí konjugace GSH s hydrofobními a elektrofilními sloučeninami. GST dělíme do 4 hlavních skupin: cytosolické GST, mitochondriální GST, mikrosomální GST a bakteriální fosfomycin-rezistentní proteiny. Tyto enzymy jsou dále zodpovědné za regulaci redoxní homeostázy v buňce proti působení ultrafialovému záření a oxidačnímu stresu. Jejich funkci nalezneme také v buněčné signalizaci a apoptóze, nebo třeba v biosyntéze a transportu sekundárních metabolitů [14, 15].

1.3 Funkce glutathionu

Mezi hlavní funkce GSH patří detoxikace xenobiotik a jejich derivátů. GSH je schopen tvořit s těmito sloučeninami (elektrofilny) konjugáty a to buď spontánně, nebo enzymatickými reakcemi katalyzovanými enzymem GST. Konjugační reakce GSH nevratně spotřebovávají intracelulární zásoby GSH. Konjugáty jsou pak obvykle vylučovány z buňky a mohou podléhat štěpení γ -glutamyllové skupiny za vzniku konjugátu cysteinylglycinu, který je dále štěpen dipeptidázami na konjugát cysteinylu. Následuje N-acetylace, kterou vzniká kyselina merkapturová. Pouze výjimečně je produkt těchto konjugačních reakcí reaktivní [16].

GSH je dále důležitý pro udržení redoxní rovnováhy a stavu thiolových proteinů. V udržování této rovnováhy hrají důležitou roli sloučeniny zvané thioly. AMK obsahující

thiolovou skupinu jsou homocystein, taurin, methionin a cystein, přičemž nejdůležitější pro buněčný metabolismus savců je methionin a cystein, který je součástí struktury GSH. Thiolovou skupinu GSH lze lehce oxidovat na GSH disulfid (GSSG), který pak může být zpětně redukován enzymem GR. Rovnováhu těchto dvou reakcí pak popisuje poměr GSH/GSSG, které se mění v závislosti na oxidačním působení. Oxidace v intracelulárním redoxním prostředí vede k oxidaci thiolové skupiny proteinů a ovlivňuje tak funkci různých enzymů, receptorů a transportérů. Proto za nepříznivých podmínek může GSH tvořit reverzibilní disulfidové vazby s proteinovými thioley a tím preventivně zamezit nežádoucí oxidaci [17].

Antioxidační funkce GSH spočívá v redukci peroxidu vodíku v přítomnosti GPx, kdy GSH je oxidován na GSSG, který může být vrácen zpět GSSG reduktázou. Přítomnost GSH je obzvláště důležitá v mitochondrii, kde se nevyskytuje kataláza, která také štěpí peroxid vodíku. Velký oxidační stres může způsobit neschopnost redukce GSSG na GSH a dochází tak k jeho akumulaci. Aby byla zachována rovnováha, je GSSG transportován mimo buňku a nebo reaguje se thiolovou skupinou proteinů za tvorby disulfidu [16].

Hladina GSH je asociována s časou proliferativní odpovědí a je esenciální pro vstup buňky do S-fáze. Účastní se také modulace buněčné smrti, a to regulací redoxního stavu specifických zbytků thiolových proteinů, např. nukleárního faktoru κ B (NF- κ B), které jsou zahrnuty v buněčné smrti. Vyčerpání GSH hraje důležitou roli v iniciaci apoptózy různých typů buněk a výrazná deplece vede ke zvýšené hladině ROS a RNS, k dysfunkci mitochondrií a depleci ATP. Tím může dojít ke konverzi apoptózy v nekrózu [16].

1.3.1 Funkce glutathionu v apoptóze

Glutathion zastává důležitou funkci v oblasti buněčné ochrany proti oxidačnímu působení, podílí se na redoxní regulaci proteinových thiolů a zajišťuje redoxní rovnováhu buňky, což je z hlediska apoptózy významné. Posun rovnováhy GSH/GSSG na stranu oxidované formy (GSSG) je důležitým buněčným signálem a může být rozhodujícím pro osud buňky. Snížená buněčná hladina GSH může být způsobena vlivem oxidace GSH působením ROS a nebo exportem GSH ven z buňky. Oxidanty-indukovaná apoptóza je asociována s nerovnováhou systému GSH/GSSG, která předcházela porušení integrity, uvolnění cytochromu C a aktivaci kaspázy 3. Uvolnění cytochromu C je časným kritickým momentem apoptózy a má dva kroky. Nejdříve dochází k jeho uvolnění

z vazby na kardiolipin vlivem mitochondriálních ROS a následuje permeabilizace vnější mitochondriální membrány a k jeho uvolnění do cytosolu. Permeabilizaci zapříčiňuje tvorba póru, která je indukována proapoptotickými proteiny Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). Kaspázy obsahují katalytické oblasti, které jsou citlivé na ROS a změny v redoxním prostředí. Experimenty ukázaly, že zvýšená hladina H₂O₂ měla za následek inhibici aktivace kaspáz a to prostřednictvím změny stavu GSH, nebo pomocí oxidace katalytické části cysteinu. GSH se také podílí na post-transkripční modifikaci specifických cysteinových zbytků v procesu S-glutathionylace, při které dochází k tvorbě disulfidů mezi redox-senzitivním cysteinem a GSH. To je klíčové například při regulaci tumor nekrotizujícím faktorem α (TNF- α)-indukované apoptózy pomocí S-glutathionylace a glutaredoxinem řízené deglutathionylaci kaspázy 3. Další studie ukázaly spojitost GSH s apoptózou zprostředkovanou receptorem smrti (Fas receptor), kdy dostatek GSH byl klíčovým faktorem pro aktivaci prokaspázy 8, a naopak deplece GSH potlačila Fas-indukovanou apoptózu ve spojení s inhibicí aktivace prokaspázy 8 [18].

K depleci GSH dochází aktivním procesem vytlačení GSH přes plazmatickou membránu, čímž předchází oxidačnímu stresu vlivem ROS a je nezbytným procesem pro progresi apoptózy. Studie ukazují, že oxidační post-translační modifikace proteinů regulovaných glutathionylací a nitrosylací jsou důležitou částí regulace apoptózy [19].

2 Nukleární erytroidní faktor 2

Nukleární erytroidní faktor 2 (Nrf2) je součástí rodiny proteinů *Cap ,n' Collar* (CNC). Reguluje expresi několika desítek genů, u kterých se váže na antioxidační responzivní element (ARE). Tyto geny jsou klíčové pro xenobiotický metabolismus, řadu antioxidačních mechanismů, metabolismus sacharidů a lipidů, metabolismus železa, degradaci proteinů, a nebo také pro regulaci zánětu. Nrf2 je schopen koordinovat reakce na různé formy stresu a pomáhá tak udržet homeostázu. Cílové geny Nrf2 ovlivňují reakce eliminující ROS, syntézu glutathionu, antioxidačních proteinů a enzymů. Aktivací těchto genů indukuje odpověď na oxidační stres, který by v opačném případě vedl k zánětu [20, 21].

2.1 Transkripční faktory

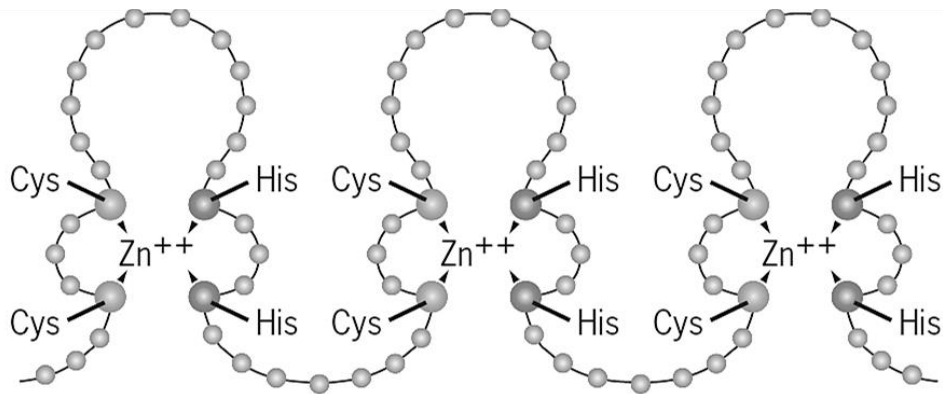
Nrf2 se jako transkripční faktor (TF) podílí na iniciaci transkripce. TF jsou skupinou proteinů, které dokáží rozpoznat specifické sekvence deoxyribonukleové kyseliny (DNA) pro kontrolu chromatinu a transkripce. Tvoří tak komplexní systém, který řídí expresi genomu. Jsou hlavními regulátory podílejícími se na kontrole procesů, které charakterizují specifické buněčné typy a jejich vývoj, ale také na kontrole specifických procesů, jako jsou imunitní odpovědi, buněčná proliferace a diferenciace. Jeden TF dokáže regulovat řadu různých genů a tím i transkripci v různých typech buněk. To, jaké specifické sekvence tyto faktory váží, označujeme jako tzv. motivy, tedy soubor krátkých příbuzných sekvencí, které jsou preferovány daným TF a které můžeme použít pro skenování delších sekvencí (např. promotorů) k identifikaci vazebných míst [22].

2.1.1 Struktura transkripčních faktorů

Řada TF má charakteristickou strukturu, která vznikla spojením AMK a jejího polypeptidového řetězce. Tyto struktury mají významnou schopnost vázat DNA [23].

První strukturou TF je zinkový prst, který tvoří širokou skupinu proteinů, z nichž většina jsou právě TF. Tato struktura je dále dělena do podskupin Cys2His2, Cys3His, Cys3HisCys4, Cys2HisCys5, Cys4HisCys3, Cys2HisCys, Cys4, Cys6 a Cys8, a to na základě pořadí cysteinových (Cys) a histidinových (His) zbytků v sekundární struktuře proteinu. Nejrozšířenější strukturou DNA-vázajících proteinů je Cys2His2. Ta je tvořena krátkým polypeptidovým řetězcem s dvěma histidiny a dvěma cysteiny, které drží zinkový iont pomocí koordinační vazby. Tato struktura se skládá z α -helixu

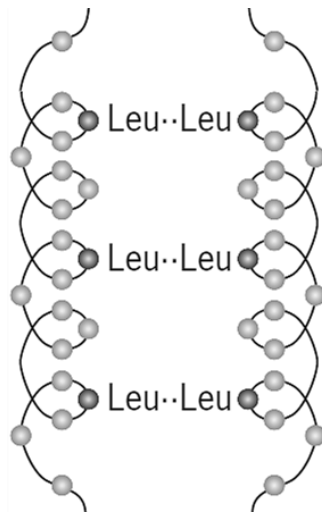
a antiparalelní β struktury. Na rozpoznávání DNA se podílejí čtyři AMK zbytky nacházející se v N-terminální části α -helixu. Mezi dvěma AMK je peptidový segment, který vyčnívá z těla proteinu, viz. obr. 5 [24, 25, 26].



Obrázek 5: Struktura zinkového prstu. Cys – cystein, His – histidin, Zn – zinek. Převzato z: [23].

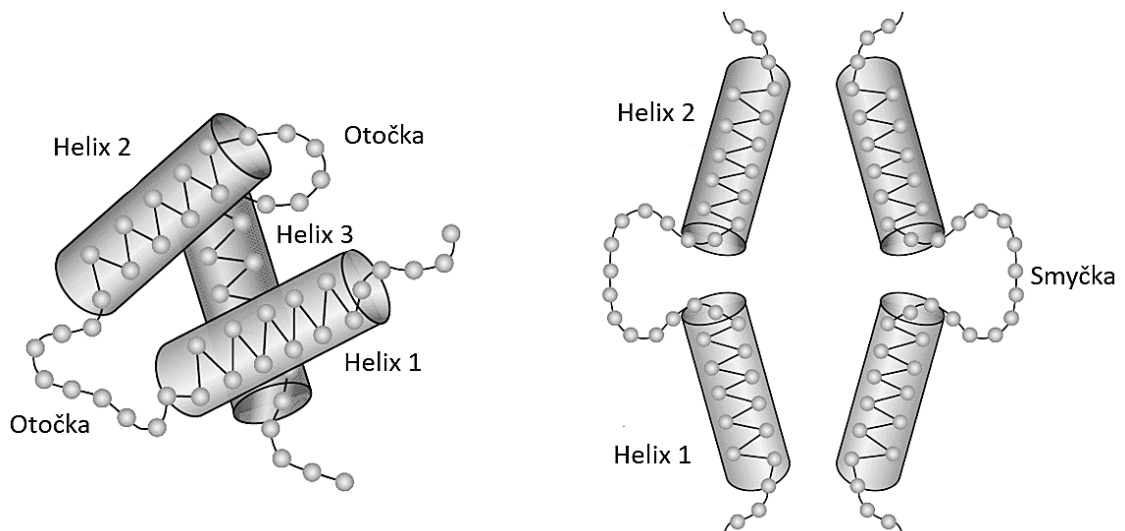
Druhou strukturou TF je spirála-otočka-spirála (HTH, *helix-turn-helix*). Struktura HTH je složena ze stabilizačních a rozpoznávacích helixů, které se sebe odděleny ostrou otočkou, viz. obr. 7. Za vazbu DNA je zodpovědný helix nejbližší ke karboxylovému konci. Monomery HTH motivů nejsou známy a nejjednodušší proteiny s touto strukturou jsou dimerní Arc represory a proteiny se třemi helixy. Ve velkém množství transkripčních faktorů se motiv HTH shoduje se strukturální doménou 60 AMK nazývanou homeodoména, která byla objevena poprvé u octomilek [23, 27].

Třetí struktura TF je leucinový zip (bZIP). Ten je tvořen úsekem AMK a na každém sedmém místě se nachází leucin, přes který se může vytvořit dimer, viz. obr. 6. Po spojení dvou zipů se kladně nabitě části AMK od sebe vzdálí a vytvoří tak prostor pro navázání negativně nabitě DNA [23].



Obrázek 6: Struktura leucinového zipu. Leu – leucin. Převzato z: [23].

čtvrtou strukturou TF je spirála-smyčka-spirála (HLH, *helix-loop-helix*). Jedná se opět o strukturu vyskytující se u řady TF. HLH doména je doprovázena základní DNA-vázající doménou a je složena ze dvou helixů, které jsou od sebe odděleny smyčkou, viz. obrázek č. 7. Dimerizaci mezi dvěma polypeptidy umožňují helixy. Některé HLH proteiny navíc obsahují strukturu bZIP a nesou tak označení bHLHZIP [23, 28].

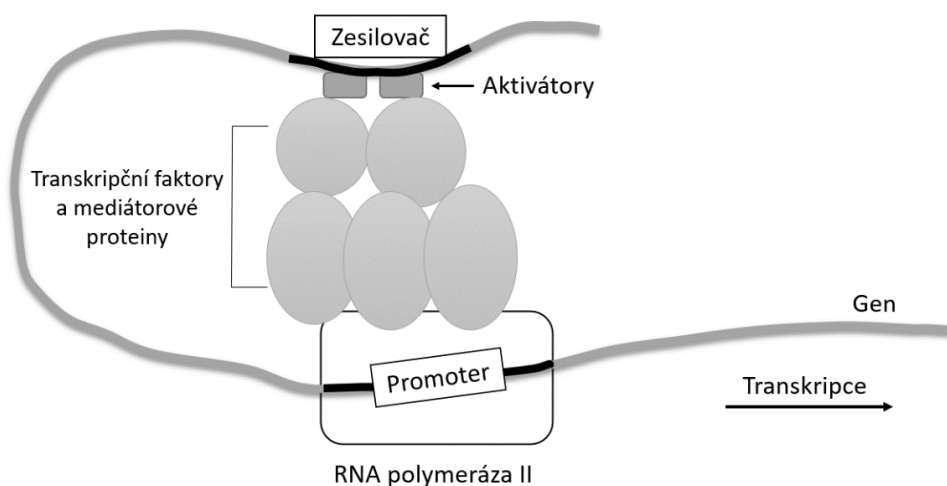


Obrázek 7: Struktura Helix-turn-helix (vlevo) a Helix-loop-helix (vpravo). Převzato z: [23].

2.1.2 Mechanismus působení

Ve struktuře TF jsou jak specifické úseky zodpovědné za vazbu k DNA, která je stěžejní pro jejich aktivitu, tak i úseky, které mají stimulační či inhibiční efekt na transkripci. Aby se TF mohl navázat na DNA, musí obsahovat tzv. aktivační doménu, která je často bohatá na AMK a na zbytky glutaminu či prolinu. Aktivační domény reagují s komponenty bazálního transkripčního komplexu. Jedná se o komplex ribonukleové (RNA) polymerázy II a několika TF, jako je např. transkripční faktor IIB (TFIIB) a transkripční faktor IID (TFIID), který tvoří genový promotor a je klíčový pro začátek transkripce [29].

Promotor je úsek DNA, kterou rozeznávají jednotlivé TF a jehož funkce je iniciace transkripce konkrétního genu a účastní se tak počátku transkripce. Další důležitou částí je zesilovač, což je úsek DNA, který slouží k zesílení transkripce a je v kontaktu s promotorem pomocí DNA smyčky. Aktivační domény TF reagují buď přímo se specifickými komponenty, nebo reagují s jinými molekulami (mediátorovými proteiny), které následně reagují s komplexem. Navázáním TF na DNA pomocí DNA-vázací domény dochází k interakci aktivační domény TF s bazálním transkripčním komplexem a dochází ke stimulaci/inhibici transkripce. Mechanismus TF znázorňuje obr. 8. Inhibiční faktory mohou s komplexem interagovat přímo nebo nepřímo, a mohou tak inhibovat transkripci. Vzájemný balanc mezi faktory stimulačními a inhibujícími transkripci pak ovlivňuje míru transkripce [29, 30].



Obrázek 8: Mechanismus působení transkripčních faktorů. RNA - ribonukleová kyselina.

2.2 Struktura Nrf2

Nrf2 patří do skupiny CNC s bZIP doménou. Je to protein modulární struktury se sedmi Nrf2-homologními doménami, značenými Neh1-7 (viz obr. 9), kdy každá z nich zastává odlišnou funkci. Neh-1 je doména skládající se z CNC-bZIP a je důležitá pro vazbu DNA a asociaci s malými proteiny muskuloaponeurotického fibrosarkomu (sMaf). Doména Neh-2 je složená ze dvou vysoce zachovalých úseků AMK: *Disc Large* (DLG) motivu a AMK zbytků glutamát-threonin-glycin-glutamát (ETGE) motivů, které zprostředkovávají interakci s negativním regulátorem Keap1 a sedmi lysinovými zbytky určenými pro ubikvitinaci a následnou proteasomální degradaci Nrf2. Doména Neh-3 je zodpovědná za transkripční aktivitu a spolupracuje s Neh-4 a Neh-5. Předposlední Neh-6 doména je oblast s vysokým podílem serinu, obsahuje dva zachovalé peptidové motivy a podílí se proteasomální degradaci Nrf2. Poslední Neh-7 doména je zodpovědná za potlačení transkripční aktivity Nrf2 pomocí retinoidního receptoru X α [31].

2.2.1 sMAF a Bach1

Maf proteiny jsou DNA-vázající TF s bZIP motivem. Jsou schopny tvořit homodimery a vázat se na Maf-rozpoznávající element (MARE). Dělí se do dvou skupin: velké Maf faktory, které obsahují transkripční doménu a aktivují transkripci, a malé Maf (sMAF), které tuto doménu postrádají a transkripci inhibují. Homodimery sMAF se chovají jako kompetitivní inhibitory TF s bZIP doménou působících na MARE. Další důležitá funkce sMAF je role partnerských molekul s CNC. Nrf2 tvoří heterodimer s sMAF proteiny a následně rozpoznává ARE oblasti genomu. Mezi tyto proteiny řadíme MafF, MafG a MafK a jsou členy bZIP rodiny TF. Za homo- či heterodimerizaci s CNC a Bach proteiny je zodpovědná část leucinový zip. K této dimerizaci dochází proto, že CNC a Bach proteiny nejsou schopné samostatné vazby na DNA a je k tomuto kroku vyžadována interakce s sMAF proteiny. Nrf2 a sMAF spolu takto tvoří komplexní síť TF, které se vzájemně ovlivňují [31, 32].

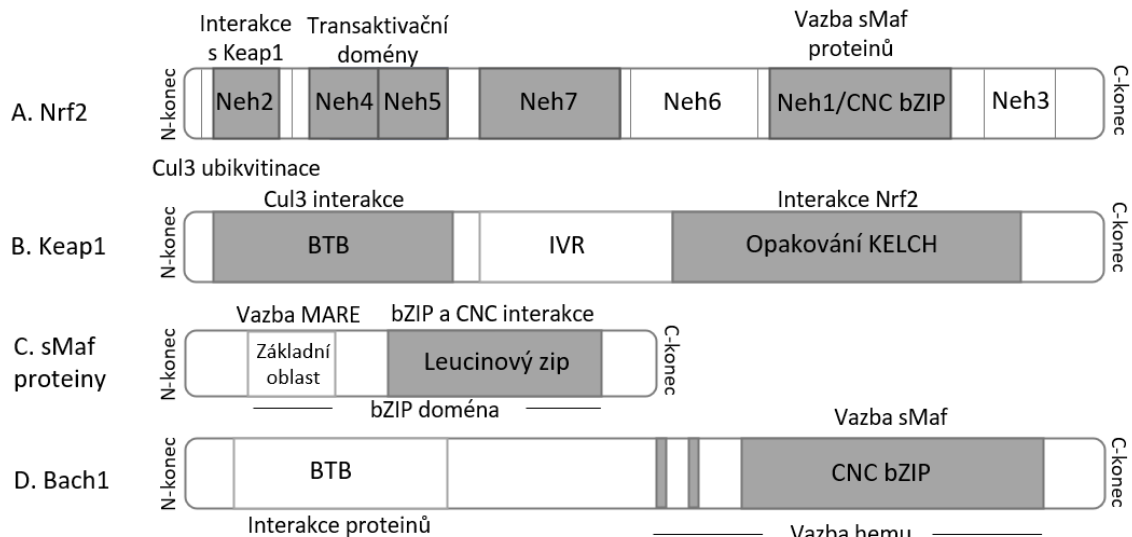
Protein Bach1 je *Brick and Brack* (BTB) a CNC homolog 1, který patří do rodiny CNC transkripčních faktorů a je považován za transkripční represor. Heterodimer Bach1-sMaf váže opakující se sekvence ARE, které se vyskytují např. v genu hemoxygenázy 1 (HO-1), a naruší tak expresi daného genu. Geny kódující další proteiny fáze 2, jako jsou NADPH-chinon dehydrogenáza 1 (NQO1), GST a GCL, obsahují pouze jednu ARE sekvenci a nejsou tedy řízeny Bach1. Funkce tohoto transkripčního represoru je

regulována redoxním stavem a redoxně-dependentní modulace Bach1 způsobuje na Nrf2 nezávislou aktivaci ARE. Oxidace cysteinových zbytků v DNA vázající doméně indukují disociaci Bach1 od ARE a eventuelně upreguluje transaktivaci ARE na nepotlačenou úroveň. Doménovou reprezentaci Bach1 i sMAF znázorňuje obr. 9 [33].

2.3 Systém Keap1-Nrf2 v buňce

Nrf2 je redox-senzitivní faktor zajišťující redoxní rovnováhu a podílí se tak na antioxidační ochraně mitochondrií za nepříznivých podmínek. Mitochondrie hrají důležitou roli v řadě biochemických procesů (např. při oxidativní fosforylaci, β -oxidaci mastných kyselin) a aby došlo k zachování homeostázy, neustále mění svoji morfologii (= tzv. mitochondriální dynamika) jako odpověď na vnější či vnitřní mikroprostředí. Tím mitochondrie přizpůsobuje svoji aktivitu fyziologickým nárokům potřebným k produkci ATP, homeostáze Ca^{2+} a k regulaci ROS. Za běžných podmínek se Nrf2 nachází ve vazbě na cytoplazmatický protein *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), který je jeho negativním represorem, brání jeho translokaci do jádra buňky a zprostředkovává jeho polyubikvitinaci a tím jeho následnou protozomální degradaci. Během oxidativního stresu však dochází vlivem elektrofilů a ROS ke kovalentní modifikaci SH- skupiny proteinu Keap1, tím dochází k inhibici degradace Nrf2 a k jeho přesunu do jádra, kde transaktivuje několik ARE-nesoucích genů (např. GST) [34].

Keap1 je negativním regulátorem Nrf2. Podněcuje jeho degradaci za běžných nestresových podmínek a funguje jako biosenzor elektrofilů a ROS: během stresového působení dochází k narušení redoxní rovnováhy vlivem stimulů a tím k modifikaci thiolových skupin Keap1 a následné inaktivaci Keap1. To způsobí stabilizaci Nrf2 a dojde k indukci cytoprotektivních genů. Díky tomuto procesu je systém Keap1-Nrf2 důležitým obranným mechanismem proti nepříznivému vlivu okolního prostředí. Za běžných podmínek tvoří Keap1 v cytoplazmě buňky komplex ubiquitin E3 ligázy s CULLIN3 (CUL3) a polyubikvitinuje Nrf2, což má za následek rychlou degradaci Nrf2. Vlivem působení ROS nebo elektrofilů dochází k modifikaci reaktivních cysteinových zbytků Keap1, dojde ke snížení aktivity komplexu Keap1-CUL3 a nedojde k degradaci Nrf2, ale naopak k jeho stabilizaci. Ten je následně přemístěn do jádra, kde jako heterodimer s sMAF váže ARE. Doménová struktura Keap1 je znázorněna na obr. 9 [32].



Obrázek 9: Doménová reprezentace Nrf2, Keap1, sMAF a Bach1. Nrf2 – nukleární erytroidní faktor, Keap1 – Kelch-like ECH-associated protein 1, sMaf – malé proteiny muskuloaponeurotického fibrosarkomu, CNC – Cap ,n‘ Collar, BTB – Brick ,n‘ Brack, MARE – Maf-rozpoznávající element, bZIP – základní leucinový zip, Cul3 – Cullin 3, IVR – zasahující region. Převzato z: [35].

2.4 Regulace aktivity Nrf2

Aktivace Nrf2 může být regulována na transkripční a post-transkripční úrovni, a to prostřednictvím regulace stability Nrf2, post-transkripčních modifikací a dostupností vazebných partnerů [31]. Nesprávná regulace cesty Keap1-Nrf2-ARE je součástí několika onemocnění. Správné fungování je důležité pro kontrolu oxidačního stresu a pro ochranu buněk. Nedostatečná aktivita Nrf2 tak může vést ke zhoršení oxidačního poškození a poškození vlivem zánětu. To může být významné u řady onemocnění, jako například Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Diabetes mellitus, astma, rakovina aj. Nadměrná aktivace však může být také riziková, protože dochází k nežádoucí protekci nádorových buněk [20].

2.4.1 Rozpad Nrf2-Keap1

Keap1 je složen ze dvou domén: N-terminální BTB domény a C-terminální Kelch domény. Ty jsou spojeny intervenující oblastí. Cysteinové zbytky Keap1 se chovají jako elektrofilní senzory a dokáží tak reagovat na endogenní i exogenní ROS. Mezi tři hlavní cysteinové zbytky patří Cys151 nacházející se v BTB doméně a Cys273 s Cys288 vyskytující se v intervenující oblasti. Cys151 je hlavním senzorem oxidačního stresu

a narušuje interakci Keap1-Cul3, což vede k rozpadu Nrf2 od Keap1. Cys273 a Cys288 naopak hrají důležitou roli z pohledu konformačních změn Keap1. Dalším příkladem mohou být cysteinové zbytky Cys226, Cys613 s His225, které jsou podstatné pro detekci Cd^{2+} , As^{3+} , Se^{4+} a Zn^{2+} . Mezi těmito senzory existuje redundance, která umožňuje přetrvávající akumulaci oxidantu i přes ztrátu funkce daného senzoru, a to umožňuje přežití buněk předcházením nadměrné spotřeby glutathionu a následnému oxidačnímu stresu [36].

Další možností oddělení Nrf2 od Keap1 je kompetitivní vazba jiného proteinu. Protein sekvestozom 1 (SQSMT1/p62) se podílí na aktivaci Nrf2 tak, že se naváže na Keap1 pomocí motivu značeného jako Keap1-interagující oblast a tím blokuje vazbu Keap1 k Nrf2. Tento motiv tak stabilizuje Nrf2 a inhibuje Keap1. Zároveň je indukce p62 genu zprostředkována pomocí Nrf2 a to přes ARE přítomného v promotoru p62. Hladiny p62 a Nrf2 jsou na sobě vzájemně závislé a během stresového působení na sebe vzájemně tyto dva proteiny působí tak, aby byla udržena jejich vysoká hladina [37].

2.4.2 Regulace na transkripční úrovni

Transkripce genu Nrf2 – *NFE2L2* je regulována několika TF. Příkladem je aryl hydrokarbonový receptor (Ahr), který je schopen indukovat Nrf2 jako odpověď na vystavení polycyklickým aromatickým uhlovodíkům. Ahr se tak naváže ve formě heterodimeru s Ahr nukleárním translokátorem na sekvence podobné xenobiotickému responzivnímu elementu (XRE) v promotorové oblasti *NFE2L2* a tím dojde k aktivaci transkripce. Za regulaci pomocí AhR jsou zodpovědné jeho ligandy, jako je například 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxin – TCDD. Oblast promotoru navíc obsahuje vazebné místo pro NF- κ B a díky tomu může být tímto faktorem regulován. Aktivace NF- κ B pak zprostředkuje upregulaci tohoto genu a přispěje ke zvýšeným hladinám Nrf2, což má za následek například rezistenci k chemoterapii při akutní chronické leukémii. Dále například onkogenní a Notch signální dráhy zvyšují transkripci *NFE2L2*, čímž zvyšují bazální Nrf2 a podporují tím jeho protumorogenní účinky. Autoregulace Nrf2 proteinu je možná díky přítomnosti ARE-like sekvencím v oblasti jeho promotoru, tím se prodlouží doba exprese genu a následně se zvýší tvorba daného proteinu. Nrf2 může ale naopak stimulovat expresi genu Keap1, který poté způsobuje jeho vlastní degradaci, jedná se o mechanismus negativní zpětné vazby [31, 38, 39, 40].

2.4.3 Regulace na post-transkripční úrovni

MicroRNA (miRNA) je typem nekódující RNA. Všechna miRNA, která ovlivňují Nrf2 a Keap1, ale i další proteiny, které se účastní ochrany proti oxidačnímu stresu, označujeme jako miR. MiR-432 se váže na kódující oblast transkriptu Keap1, inhibuje interakci Keap1 s Nrf2 a tím podpoří aktivaci Nrf2. Zvýšená hladina miR-144 je asociována se sníženou hladinou Nrf2, sníženou regenerací glutathionu a špatnou tolerancí vůči oxidačnímu stresu. Další možností regulace je pomocí sestřihu. U určitých typů karcinomů byly pozorovány varianty transkriptu *NFE2L2*, které postrádaly exon 2 a 3. Izoformy Nrf2, které byly kódovány těmito transkripty postrádají doménu pro interakci s Keap1, což má za následek stabilizaci Nrf2 [31, 41].

3 Úloha Nrf2 v buňce

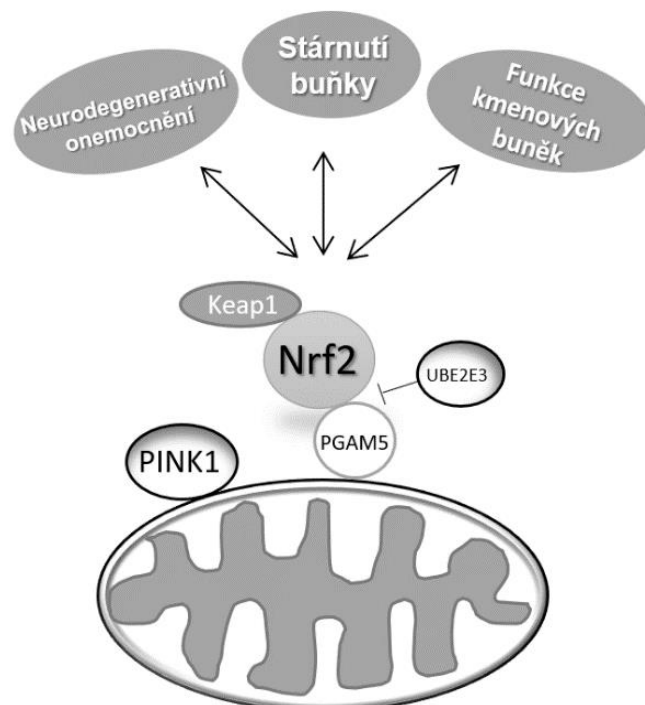
Nrf2 reguluje expresi skoro 250 genů, které jsou zodpovědné za udržování stálého buněčného prostředí. Mezi tyto geny řadíme i různé antioxidační a detoxikační geny enzymů, které jsou schopné eliminovat ROS a udržovat tak redoxní rovnováhu buňky. S věkem dochází k poklesu aktivity Nrf2, což můžeme pozorovat v různých typech buněk, včetně cévních, srdečních, epiteliálních, ale i ve fibroblastech. Vyčerpání pak vede k předčasnému stárnutí fibroblastů, snížení biologické funkce, zvýšení oxidačního stresu a ke zrychlenému stárnutí endoteliálního progenitoru buněk. Mechanismus aktivace Nrf2 je tvořen komplikovanou sítí signalizačních drah a mechanismů a je důležitý pro kontrolu a oddálení buněčného stárnutí a léčbu nemocí spojovaných se stárnutím. Buněčné stárnutí je biologický proces, při kterém dochází k zástavě buněčného cyklu po proběhnutí následných replikačních cyklů a nebo po vystavení buňky stresu. Dále dochází k vnitrobuněčnému poškození zahrnující depleci telomer, ztrátě proteostázy, narušení funkce mitochondrií a ke zvýšení oxidačního stresu [42].

Mitochondrie je hlavním místem buňky pro výrobu energie a během tohoto procesu, zvaného fosforylace, dochází také ke vzniku ROS. Správnou funkci a zdraví mitochondrie odráží potenciál mitochondriální membrány. Ten je za fyziologických podmínek udržován mitochondriálním dýchacím řetězcem. Studie ukázaly, že složka elektronového transportního řetězce NDUFA4 je regulována pomocí Nrf2 a jeho upregulace vede ke snížení aktivity podjednotky cytochrom c oxidázy COX-2 a COX-4I1. Při zvýšené produkci ROS dochází k Nrf2-dependentní transkripční upregulaci mitochondriálního uncoupling proteinu 3, který je zodpovědný za zvýšenou protonovou vodivost vnitřní membrány a tím chrání před nadměrnou produkcí superoxidů. Nedostatek Nrf2 také vede ke snížené oxidativní fosforylaci a ke změně způsobu, jakým buňka produkuje ATP. Za běžných podmínek je hlavním zdrojem ATP oxidativní fosforylace, ale v nepřítomnosti Nrf2 se stává hlavním zdrojem ATP glykolýza. Buňky neobsahující Nrf2 prokazují snížené buněčné dýchání, sníženou hladinu ATP a dochází u nich také k narušení oxidace mastných kyselin. Nrf2 se také pravděpodobně podílí na udržení mitochondriální integrity během oxidačního stresu [43, 44].

Mitofagie je proces podílející se na udržení mitochondriální integrity, a to selektivním odstraňováním poškozených mitochondrií. Důležitou součástí mitofagie je SQSTM1/p62, který interaguje s vazebným místem Nrf2 u Keap1 a soutěží tak s Nrf2 o vazbu. Takto dochází k regulaci Nrf2 pozitivní zpětnou vazbou - čím vyšší je hladina

p62, tím vyšší je aktivita Nrf2. Induktor mitofagie zprostředkovaný p62 (PMI) přímo narušuje vazbu Nrf2-Keap1 a indukuje mitofagii nezávisle na mitochondriálním potenciálu či homologem fosfatázy a tenzinu (PTEN)-indukovaná protein kináza 1 (PINK1). Nrf2 a Keap1 se mohou nacházet na vnější mitochondriální membráně ve vazbě na člena rodiny proteinů mitochondriální fosfatázy – fosfoglycerátmutázu (PGAM5). Distribuci a aktivitu Nrf2 pak v tomto místě reguluje ubikvitin-konjugující enzym E2 E3 (UBE2E3) a jeho nukleární receptor importin 11, viz. obr. 10 [43].

Nrf2 chrání buňky před neurodegenerativním onemocněním, které je často vyvoláno oxidačním stresem, nesprávnou funkcí mitochondrií a chybným skládáním proteinů. Mezi tato onemocnění patří roztroušená skleróza, Parkinsonova, Huntingtonova a Alzheimerova choroba. V terapii těchto onemocnění mohou najít uplatnění aktivátory Nrf2, konkrétně např. sulforafan, který zprostředkovává aktivaci Nrf2, která vede ke zlepšení mitochondriální funkce a tím přispívá ke zvrácení abnormalit chování u autismu. V neposlední řadě se snížená hladina Nrf2 spojuje se sníženou regenerační schopností nervových kmenových a progenitorových buněk, ale také se syndromem předčasného stárnutí (Hutchinson-Gilfordův syndrom) [43].



Obrázek 10: Regulace Nrf2 v mitochondrii. UBE2E3 – ubikvitin-konjugující enzym E2 E3, PTEN = homolog fosfatázy a tenzinu, PINK1 – PTEN-indukovaná protein kináza 1, PGAM5 – fosfoglycerátmutáza, Nrf2 – nukleární transkripční faktor. Převzato z: [43].

3.1 Role v zánětlivé reakci

Vlivem různých stimulů může dojít k narušení homeostázy a docházet k zánětu, který probíhá jako kaskáda velkého množství reakcí. Prvním krokem zánětlivé odpovědi je detekce zánětlivého signálu, či již poškozené tkáně. Detekce zánětu je zprostředkována pomocí patogenem asociovaných molekulových vzorů (PAMP) a molekulárních vzorů asociovaných s poškozením (DAMP). PAMP se nachází na povrchu patogenů, zatímco DAMP jsou známkou endogenního poškození buňky. Tyto vzory jsou následně detekovány receptory rozpoznávající molekulové vzory (PRR) [45].

Po rozpoznání vzorů dochází k aktivaci signálních drah, a to buď Toll-like receptory (TLR), nebo inflamatomy. Následná aktivace NF- κ B procesem disociace od inhibitoru I κ B způsobí jeho přesun do jádra, kde je schopen indukovat zvýšení transkripce specifických proteinů. To má za následek další kaskádu reakcí, zahrnujících například produkci prozánětlivých cytokinů včetně TNF- α . Cytokiny pak rekrutují další buňky imunitního systému (monocyty, neutrofilů) a dochází k tvorbě ROS a RNS. Buňky imunitního systému produkují cytokiny a chemokiny, které způsobí další přesun buněk do místa zánětu, a následkem toho dochází k respiračnímu vzplanutí a zvýšenému oxidačnímu stresu. Aktivace TF, jako je NF- κ B a Nrf2, je klíčovou součástí signální kaskády a odpovědi na oxidační stres. Aby byly buňky schopny odolávat různým stresorům, musí mít vyvinuté ochranné mechanismy zahrnující řadu cytoprotektivních genů. Většina těchto genů obsahuje ARE, díky kterým může být transkripce modulována vazbou TF, z nichž nejvýznamnějším je Nrf2 [45, 46].

Ten je součástí několika mechanismů, prostřednictvím kterých může ovlivnit jak vrozenou, tak adaptivní imunitu.

3.1.1 Systém Nrf2/HO-1

HO-1 je důležitým endogenním antioxidantem. Po útoku elektrofilů či ROS na buňku dochází k disociaci Keap1 a Nrf-2 a ten je přesunut do jádra, kde interaguje s ARE, což má za následek aktivaci HO-1. Ta může, společně s jejími metabolity (CO, Fe²⁺, biliverdin), bránit nadměrné oxidaci lipidů a proteinů vylučováním volných hydroxylových radikálů, singletového kyslíku a superoxidových aniontů. Regulační role HO-1 spočívá v indukci protizánětlivých cytokinů a úpravě poměru T-helper 1 a T-helper 2 (Th1/Th2) aktivací receptoru tumor nekrotizujícího faktoru 1 (TNFR-1) a mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK). Dráha Nrf2/HO-1 má multiorganovou

protektivní a antioxidační funkci. Hraje významnou roli v redukcí mitochondriálního poškození, regulaci Ca^{2+} influxu, apoptóze, autofagii, pyroptóze a ferroptóze [47].

3.1.2 Interakce se zánětlivými mediátory

Zánět je komplexní událost, během které různé buňky produkují různé signální molekuly. Jedná se o deriváty kyseliny arachidonové (mezi které řadíme leukotrieny a prostaglandiny), fosfolipidové mediátory a cytokiny (interferony, interleukiny, TNF). Tyto molekuly jsou nadále součástí odpovědi organismu na zánět. [46]. Makrofágy a neutrofilové, významné složky vrozené (nespecifické) imunity, jsou schopny rozpoznat PAMP, mezi které patří i lipopolysacharid (LPS), který je součástí vnější membrány gram-negativních bakterií. Po rozpoznání zahájí nespecifickou imunitní reakci pomocí TLR. Vazba LPS k TLR4 aktivuje tyrosinkinázový systém, který dále vede k aktivaci NF- κ B. Pokud má neutrofil nedostatek Nrf2, jeho citlivost na stimul LPS je větší a dojde k zvýšené expresi cytokinů a chemokinů. Studie ukázaly, že Nrf2 dokáže inhibovat expresi LPS-indukovaných genů prozánětlivých cytokinů (zahrnující interleukin-6 a interleukin-1 β), a to prostřednictvím na ROS-nezávislé transkripční inhibici. Nrf2 se váže v blízkosti genů interleukinu 6 (IL-6) a IL-1 β a k inhibici tedy dochází pomocí přímé vazby na DNA. Nrf2 se běžně v případě antioxidačních a detoxikačních genů váže pomocí ARE. V případě genu IL-6 k tomu tak ale nedochází a regulace je ARE-nezávislá a z fylogenetického hlediska nejsou ARE v blízkosti IL-1 β zachovány. Nrf2 dále inhibuje na NF- κ B závislou transkripci genů protizánětlivých cytokinů. Oblasti, na které se tento TF váže, jsou odpovídající běžným oblastem prozánětlivých TF (p65, c-Jun) a z tohoto důvodu je pravděpodobné, že se Nrf2 do této oblasti dostává pomocí asociace s těmito TF. Při zánětu tedy dochází k přesunu Nrf2 do regulační oblasti genů prozánětlivých cytokinů a dochází k inhibici transkripce těchto molekul. Možností také je, že Nrf2 potlačuje transkripci těchto genů nepřímo, a sice přiváděním transkripčních represorů na komplex tvořený v blízkosti genů prozánětlivé cytokiny [46, 48, 49].

3.1.3 Nrf2 v regulaci adhezivních molekul

Během zánětlivého procesu dochází ke zvýšení exprese intracelulárních adhezivních molekul 1 (ICAM-1) a vaskulárních adhezivních molekul 1 (VCAM-1) na povrchu endotelu, makrofágů a lymfocytů vlivem IL-1 a TNF- α . Adhezivní molekuly jsou zodpovědné za přesun leukocytů a produkci cytokinů, což vede k oxidačnímu stresu

a zánětu ve tkáni. Nrf2 může zastávat regulační funkci exprese buněčných adhezivních molekul (CAM). Studie ukázaly, že snížením Nrf2 docházelo k aktivaci NF- κ B, následné sekreci TNF- α , IL-1 β a IL-6 a k výraznému zvýšení exprese intracelulární CAM-1 v mozku po zranění. V buňkách pupečnickového endotelu došlo při utlumení Keap1 ke snížení TNF- α -indukované exprese ICAM-1 a VCAM-1 a také ke zvýšení exprese HO-1 a peroxiredoxinu 1 (PRDX1) v makrofázích. Zvýšením regulace Nrf-2 signalizace tedy dochází k inhibici aktivace NF- κ B a sekrece prozánětlivých cytokinů a chemokinů a také k utlumení exprese adhezivních molekul [46].

3.1.4 Nrf2-dependentní protizánětlivé léky

Nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID) jsou látky používané zejména ke zmírnění bolesti a proti zánětu. Mezi nejběžněji užívané NSAID patří Aspirin (acetylsalicylová kyselina, ASA). Ačkoliv je farmakologické působení ASA spojováno s inhibicí syntézy prostaglandinů, další terapeuticky významné efekty této látky nebyly zcela pochopeny. ASA se podílí na zpracovávání radikálů a chrání různé typy buněk před škodlivými efekty oxidačního stresu. Ačkoliv přesný mechanismus není znám, ASA pravděpodobně zvyšuje expresi HO-1 a zvyšuje produkci oxidu dusnatého, který stimuluje dráhu Nrf2-ARE. ASA má tak preventivní a terapeutické vlastnosti z hlediska nemocí spojovaných s oxidačním stresem. Dalším nesteroidním léčivem je Celecoxib, který je inhibitor cyklooxygenázy 2 (COX)-2 a je schopný indukce genové exprese HO-1 v mesangiálních buňkách glomerulu a v cévním endotelu, na čemž se podílí ROS, extracelulárním signálem regulovaná kináza, Nrf2 a další. K této indukci dochází nezávisle na inhibici COX-2. Následná exprese HO-1 v makrofázích a buňkách vaskulární hladké svaloviny má pozitivní vliv na tyto buňky při ateroskleróze. Celecoxib svým účinkem stimuluje translokaci Nrf2 a způsobí jeho následné hromadění v jádře. K zprostředkování této translokace a následné ARE transaktivace právě Nrf2 dochází pomocí proteinových kináz, jako je proteinová kináza C, nebo MAPK. Protizánětlivé účinky jako odpověď na LPS-stimulované makrofágy také prokázaly určité buněčné metabolity, jako například fumarát. Dimethylfumarát (DMF) je schopen pomocí Nrf2 antioxidační dráhy inhibovat zánětlivé procesy, čehož se využívá při terapii roztroušené sklerózy. Metabolit DMF monomethylfumarát je schopen aktivovat Nrf2 pomocí tvorby aduktu na cysteinový senzor C151 v Keap1 při neurozánětu. V neposlední řadě konjugát monomethylfumarátu a kyseliny eikosapentaenové současně moduluje Nrf2 a NF- κ B v buněčných liniích roztroušené sklerózy a lupénky [46, 50, 51].

Steroidní protizánětlivé léky (SAD) připomínají přírodní glukokortikoidy se zvláštními rozdíly se farmakodynamice a farmakokinetice. Nejčastějšími předepisovanými SAD jsou prednison, dexametazon a budesonid. Glukokortikoidy se v buněčné cytoplazmě vážou na glukokortikoidní receptor. Po vazbě ligandu dochází u komplexu glukokortikoid-receptor ke konformační změně, která způsobí jeho translokaci do jádra. V jádře se tento komplex váže na glukokortikoidní responzivní element, který dále rekrutuje ko-aktivátory, nebo ko-represory. Komplex může také reagovat s TF, jako je NF- κ B a Nrf2. Glukokortikoidy řízená aktivace Nrf2 hraje důležitou roli různých fyziologických i patologických situacích, například při chronickém uvolňování glukokortikoidů zvyšuje ROS hladinu v játrech, dále dochází k aktivaci Nrf2, který je důležitým induktorem exprese zesilovače regenerace jater (ART) [52].

Tabulka 1: Nrf2-dependentní protizánětlivé léky. DMF – Dimethylfumarát, MMF – monomethylfumarát

	Léky
Nesteroidní	Aspirin
	Celecoxib
	DMF
	konjugát MMF a kyseliny eikosapentaenové
Steroidní	Prednison
	Dexametazon
	Budesonid

3.2 Nrf2 a glutathion

Buňky jsou schopné bojovat proti oxidačnímu stresu detoxikačními a antioxidačními enzymy fáze II, mezi které patří například HO-1, NQO1, superoxid dismutáza (SOD), GST, GCL kataláza, a další. Transkripce genů těchto enzymů je regulována prostřednictvím ARE. Za aktivaci ARE-dependentních genů je zodpovědný transkripční faktor Nrf2, který je vlivem stresového působení translokován do jádra, kde aktivuje tyto geny [53, 54].

Redoxní systém GSH zahrnuje aktivitu tří skupin enzymů: skupinu katalyzující syntézu GSH, katalyzující redukční přeměnu oxidovaného GSH a přesun GSH k jeho substrátům. Expresi genů těchto enzymů řídí Nrf2. Syntéza GSH zahrnuje aktivitu GCL, který je zodpovědný za adici kyseliny glutamové k cysteinu a je rychlost-limitujícím enzymem syntézy GSH. Druhým enzymem zúčastněným v této syntéze je GSS, který

aduje glycin a vytváří tak finální produkt, GSH. Studie ukázaly, že v primárních gliových a neuronových kulturách dochází při zvýšené expresi Nrf2 prostřednictvím adenoviru ke zvýšené syntéze GSH a zároveň ke zvýšení enzymu GSS. Nrf2 se dále podílí na expresi některých membránových transportérů, které transportují některé důležité komponenty pro GSH syntézu. Příkladem takového membránového transportéru může být excitační nosič AMK 1 (EAAC1), který je zodpovědný za transport cysteinu (rychlost-limitujícího substrátu) do neuronů. EAAC1 je regulován vlivem Nrf2 jak *in vitro*, tak *in vivo*, a narušení EAAC1 nebo Nrf2 vede k narušení syntézy neuronálního GSH. Mezi enzymy podílející se na přesunu GSH k substrátu patří GPx a GST. Izoenzymy GPx hrají důležitou roli při snižování hladiny peroxidu vodíku a oxidovaných lipidů, zatímco izoenzymy GST konjugují GSH s elektrofilů a xenobiotiky. GR je zodpovědná za redukci oxidované formy GSH za spotřeby NADPH [47].

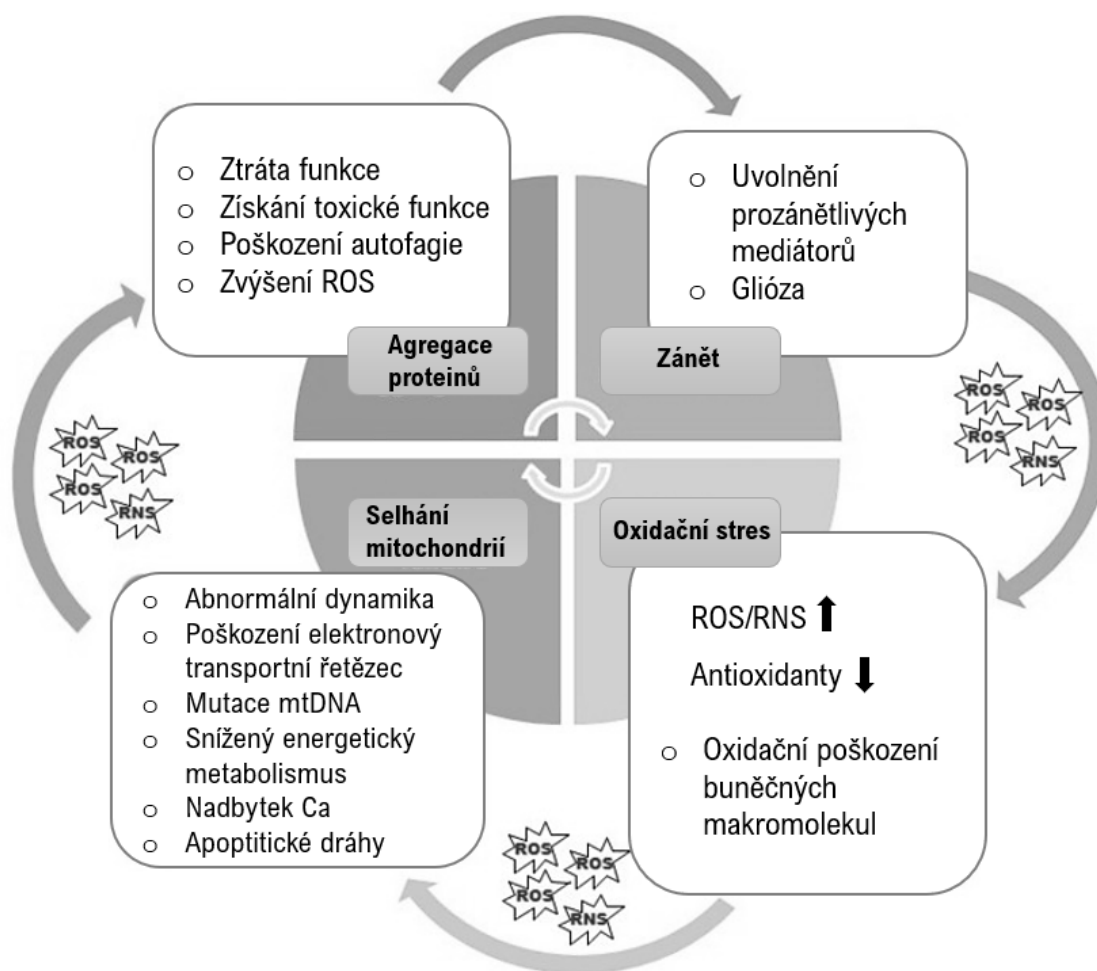
3.3 Úloha Nrf2 v neurodegenerativním onemocnění

Nrf2 je v centrální mozkové soustavě (CNS) expresován ve velké míře a jeho regulace probíhá jak v reakci na akutní mozkové příhody, tak při neurodegenerativních onemocnění. Jeho nesprávná regulace pak může přispívat ke zranění mozku. Potlačení aktivity Nrf2 vede během endogenního i exogenního působení stresu ke zvýšené neurotoxicitě. U zvířat s genetickou delecí Nrf2 nalézáme leukoencefalopatii bílé hmoty s rozšířenou astrogliózou, ale v porovnání se zvířaty stejného stáří bez této delecce je mikroglialní aktivita buněk stejná a bez celkového výskytu známek neurodegenerace. U myši s delecí Nrf2 se však vyskytoval převládající prozánětlivý mikroglialní fenotyp, a to konkrétně v oblastech mozku, které metabolizují dopamin. Pro mikroglialní aktivitu, ke které dochází při inzultech mozku, jsou typické markery (jako je např. COX-2, indukovatelná syntetáza oxidu dusnatého, IL-6 a TNF- α), které byly u myši s Nrf2 delecí zvýšeny. Naopak protizánětlivé markery, mezi které patří protein Resistin-like molekula α (RELM- α , někdy také označovaná jako Fizz-1), protein chitináza-like 3 (Chil3), argináza 1 a IL-4, byly u delecce Nrf2 sníženy. Z toho vyplývá, že u myši s deficitem Nrf2 dochází k neurodegeneraci, ale převážně v oblastech s vysokou oxidační aktivitou, tedy v oblastech metabolizujících dopamin. Deficit Nrf2 má dále dopad na Nrf2-dependentní transkripci, což má za následek zhoršení citlivosti k neurotoxinu 6-hydroxydopaminu jak u kultivovaných neuronů, tak u myši s deficitem Nrf2. Ve zvířecím modelu Parkinsonovy choroby dochází při deficitu Nrf2 k významné ztrátě dopaminového transportéru ve

stratiu (hluboká oblast šedé hmoty v koncovém mozku), ke zhoršení gliózy a degeneraci nigrostriatálního dopaminergního systému [55].

Neurodegenerativní onemocnění jsou charakterizována progresivní neurální dysfunkcí a konečnou ztrátou neuronů, která vede ke kognitivním, emočním a behaviorálním změnám, které významně zhoršují kvalitu života. Tato onemocnění jsou jednotlivě svým způsobem jedinečná, ovšem jejich základní mechanismy jsou stejné. Tyto mechanismy zahrnují vliv oxidačního stresu, nesprávnou funkci mitochondrií, chronickou zánětlivou reakci, gliózu, poruchu ve skládání proteinů, nesprávně regulovanou autofagii a proteozomální degradaci, změny mozkových lipidů, narušený metabolismus ceramidů a poškození synaptické funkce. To vše nakonec vedoucí ke smrti neuronů. Vzniklé poškození způsobí zvýšenou produkci 4-hydroxy-2-nonenalu (4HNE), který zabraňuje odstranění glutamátu inhibicí glutamátových receptorů, což má spolu s deplecí ATP za následek zvýšenou produkci NO. Za běžných podmínek je mitochondrie hlavním producentem ROS, které vznikají v elektronovém transportním řetězci oxidační fosforylace. Když dojde k poškození mitochondrie, dochází k nadměrné produkci ROS vedoucí k nedostatku ATP. Geny, které jsou spojovány s dědičnými formami Parkinsonovy choroby, jako je např. PINK1 a Parkin, jsou důležité pro kontrolu kvality mitochondrií, a zdůrazňují tak klíčovou roli mitochondriální dysfunkce a oxidačního stresu [56].

Jedním z nejdůležitějších mechanismů, který přispívá k buněčnému poškození u neurodegenerativních onemocnění, je oxidační stres. Ten vzniká, když dochází k nadměrné produkci ROS a RNS, enzymatické a neenzymatické systémy antioxidační obrany nezvládají tyto produkty zpracovat a dochází tak k narušení buněčné redoxní rovnováhy. Na oxidační stres mají vliv také přechodné kovy – převážně měď, železo a zinek. V nadbytku mohou tyto kovy katalyzovat produkci ROS ve Fentonově reakci, která produkuje hydroxylový radikál a tím dochází ke zvýšení oxidačního stresu. ROS a RNS dále reagují s dalšími molekulami jako jsou proteiny, DNA, lipidy a sacharidy, u kterých narušují jejich strukturu a funkci. Poškození proteinů pak způsobí konformační změny a dochází k jejich agregaci. Akumulace proteinů vede k rozsáhlé mikrogliální aktivaci, k aktivaci zánětlivých drah a k uvolnění zánětlivých mediátorů, což způsobí další produkci ROS, agregaci proteinů a poškození neuronů. Tento cyklus je znázorněn na obr. 11 [56].



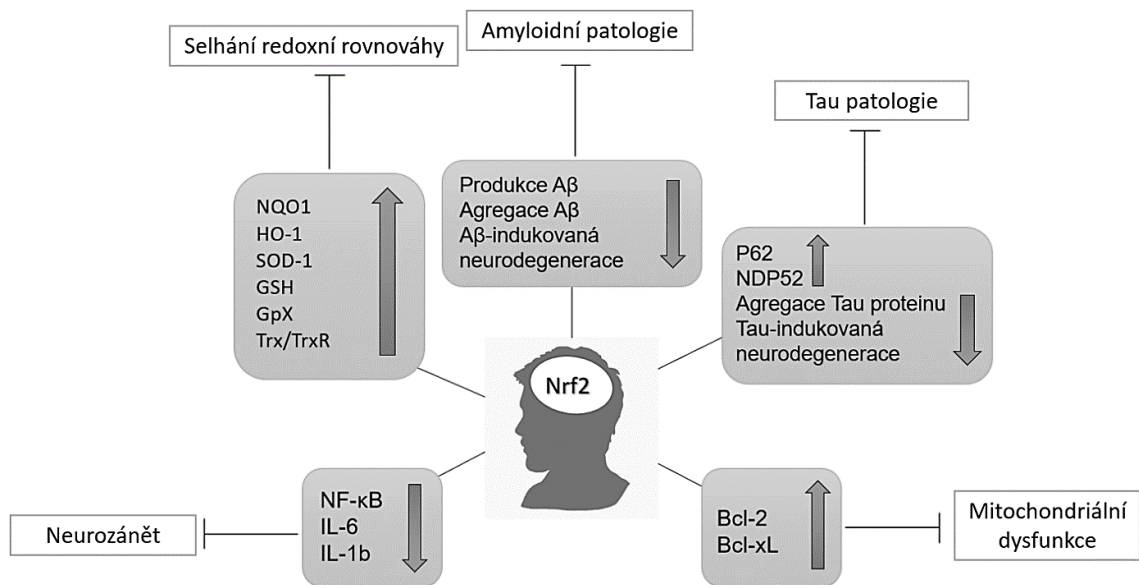
Obrázek 11: Vliv oxidačního stresu. ROS – reaktivní formy kyslíku, RNS – reaktivní formy dusíku, mtDNA = mitochondriální deoxyribonukleová kyselina. Převzato z: [56].

3.3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je onemocnění, které způsobuje degeneraci mozkových buněk a je hlavní příčinou demence. AD je považována za multifaktoriální onemocnění a její původ popisují dvě hypotézy: cholinergní a amyloidní. Jedná se o pomalu progresující neurodegenerativní onemocnění charakteristické neuritickými plaky a neurofibrilárními klubky, které jsou důsledkem akumulace amyloidního β peptidu ($A\beta$) v oblasti mediálního temporálního laloku a neokortikálních struktur [57].

Selhání signální dráhy Nrf2/ARE může změnit enzymatickou mašinerii a vést tak ke štěpení amyloidního prekurzorového proteinu (APP) a zvýšení fosforylace Tau proteinu za účasti aktivované glykogen syntázy kinázy 3 (GSK-3 β) a cyklin-dependentní

kinázy 5 (Cdk5). U pacientů s AD dochází v plazmě, mozku a moči ke snížené antioxidační enzymové aktivitě a ke zvýšeným hladinám markerů oxidačního stresu, jako např. 4HNE nebo kyselina thiobarbiturová. Studie ukázaly, že u myši s deficitem Nrf2 dochází ke zvýšené akumulaci nerozpustných fosforylovaných oligomerů Tau proteinu a amyloidních depozitů v hipokampu. Některé výsledky také indikují, že v mozku pacientů s AD nedochází ke správné odpovědi Nrf2 na oxidační stres. Patogeneze AD je dále spojena s nesprávnou funkcí mitochondrií a se zvýšenou mitofagií. Zvýšená exprese APP způsobuje sníženou regulaci Nrf2 a dalších proteinů, které se účastí mitochondriální fúze a mitofagie. Studie také ukázaly, že aktivace dráhy Nrf2/ARE dokáže chránit před toxicitou A β a léčba induktorem Nrf2 zvyšuje buněčné přežití neuronů a zároveň snižuje tvorbu A β a ROS u myši s expresí APP. Dalším důsledkem indukce Nrf2 je posunutí rovnováhy z rozpustné frakce A β na nerozpustnou, čímž pravděpodobně dochází i ke snížení samotné hladiny rozpustné peptidu A β , který je toxický. Akumulace Tau proteinu může být také snížena aktivitou Nrf2, který indukuje expresi nukleárního dot proteinu 52 (NDP52) a SQT1, který je zahrnutý v proteozomální degradaci Tau proteinu a Keap1. Z toho vyplývá, že se funkce Nrf2 ve vztahu k AD týká několika oblastí. V souvislosti s A β snižuje jeho produkci, agregaci a snižuje A β -zprostředkovanou toxicitu. Podílí se i na snížení agregace Tau proteinu a snižuje tak Tau-zprostředkovanou neurodegeneraci. V oblasti redoxní rovnováhy zvyšuje expresi antioxidačních enzymů fáze II, jako je například NQO1, HO-1, nebo také GSH. Svoji aktivitou dále snižuje aktivitu prozánětlivého faktoru NF- κ B a dalších prozánětlivých mediátorů, jako je IL-6 a IL-1 β . Svoje zastoupení má i v oblasti funkce mitochondrií, kde zvyšuje aktivitu protiapoptotických proteinů Bcl-2 a Bcl *extra large* (Bcl-xL). Schématický popis funkce Nrf2 v AD znázorňuje obr. 12 [58, 59].



Obrázek 12: Role Nrf2 v Alzheimerově chorobě. NQO1 – NADPH-chinon dehydrogenáza, NADPH - nikotinamidadenindinukleotidfosfát, HO-1 – hemoxygenáza 1, SOD-1 – superoxid dismutáza 1, GSH – redukováný glutathion, GPx – glutathion peroxidáza, Trx – thioredoxin, TrxR – thioredoxin reduktáza, A β – amyloidní β peptid, NDP52 – nukleární dot protein 52, Bcl-2 – B-cell lymphoma 2, Bcl-xL – B-cell lymphoma extra large, NF- κ B – nukleární faktor κ B, IL – interleukin. Převzato z: [59].

Pro klinickou léčbu AD bylo schváleno 5 léčiv: takrín, rivastigmin, galantamin, donepezil, memantin. Žádné z těchto léčiv však nedokáže toto progresivní onemocnění plně zastavit, dochází pouze ke zlepšení kognitivních funkcí a zároveň u nich dochází k řadě vedlejších účinků. Proto se do klinických studií zařazují různé aktivátory Nrf2, jež ovlivňuje jak Tau protein, tak A β , a jeho aktivace může mít pozitivní účinek v řadě dalších s věkem spojených onemocnění. Mezi sloučeniny, které mohou mít potenciální terapeutický účinek v léčbě AD patří benfotiamin, který nejen aktivuje dráhu Nrf2, ale také redukuje Tau protein v modelových buňkách AD. Sulforafan je elektrofilní aktivátor Nrf2, který interaguje s Cys151 v Keap1, má neuroprotektivní účinek proti A β i Tau proteinu a zlepšuje kognitivní deficit v akutním AD. Dalšími aktivátory Nrf2 jsou DMF, xanthohumol, nebo například cardamonin [59].

3.3.2 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba (PD) je pomalu progresující onemocnění, které je charakterizováno pomalou pohyblivostí, svalovou rigiditou a klidovým třesem, které jsou

důsledkem ztráty buněk černé substance (*substantia nigra*) ve středním mozku a významným snížením striatálního dopaminu. Příčinou ztráty buněk černé substance je pravděpodobně je akumulace patologických forem proteinů mozku, např. Tau proteinu, α -synukleinu (ASN) a Parkin proteinu. Mezi etiologické faktory sporadické formy PD můžeme řadit poruchu funkce mitochondrií, neurozánět, působení oxidačního stresu a poškození dráhy Nrf2/Keap1/ARE. Studie myšního modelu AD ukazují sníženou aktivitu Nrf2, zvýšenou agregaci ASN a ztrátu dopaminergních neuronů, ke které dochází po delecii Nrf2 asociované s mikroglální aktivací. V buněčném modelu agregace ASN byla zjištěna protektivní funkce Nrf2-dependentní HO-1, která chránila buňky proti toxickým účinkům železnatých iontů [58, 60].

Aktivace Nrf2 je potenciálním terapeutickým cílem v léčbě PD. Řada neuroprotektivních sloučenin působí prostřednictvím aktivace dráhy Nrf2. Mezi exogenní sloučeniny řadíme flavonoidy, sulforafan, analogy kurkuminu, chalkony, a polyfenoly. Naringenin, který patří mezi flavonoidy, chrání buňky před toxicitou 6-hydroxydopaminu zvyšováním hladin Nrf2, HO-1, GCL a GSH v modelech PD. Sulforafan v buňkách snižuje aktivitu GSK-3 β a narušuje vazbu Nrf2 a Keap1, čímž umožňuje akumulaci Nrf2. Analogy kurkuminu inhibují GSK-3 β , indukují Nrf2, čímž zvyšují neurální rezistenci k oxidačnímu stresu a vykazují také neuroprotektivní účinky proti ASN. Dráhu Nrf2 mohou také regulovat různé endogenní molekuly, kterými jsou např. oxid dusnatý, angiotensin II, prostaglandiny, nebo také produkty lipidového metabolismu, kterým je např. 4HNE [58, 60].

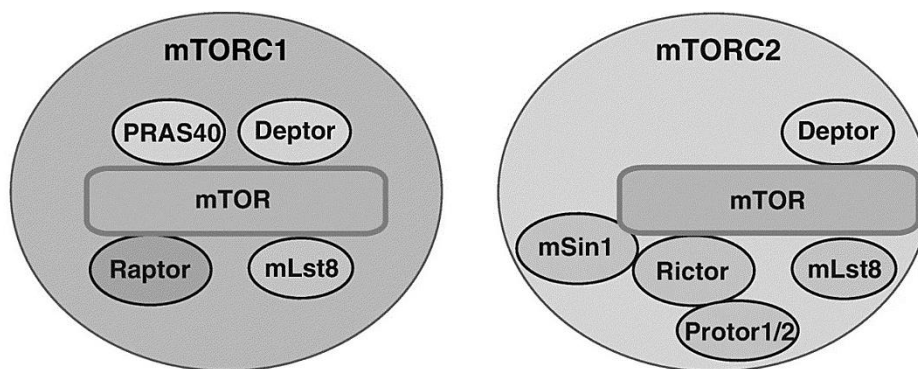
Tabulka 2: Aktivátory Nrf2 testované pro léčbu Parkinsonovy choroby

Původ	Sloučenina
Exogenní	Sulforafan
	Flavonoidy
	Polyfenoly
	Chalkony
	Analogy kurkuminu
Endogenní	Oxid dusnatý
	Prostaglandiny
	Metabolity tuků

3.3.3 Interakce mTOR a Nrf2

Savčí cíl rapamycinu (mTOR) je serin/threoninová kináza, která se podílí na kontrole buněčného růstu, buněčné proliferaci, apoptóze i autofagii. Mutace a dysregulace mTOR je často spojována s rakovinou, kardiovaskulárním onemocněním, obezitou, zánětem, diabetem, ale také s neurodegenerativními onemocněními. V mozku se mTOR vyskytuje ve vysoké míře, nachází se převážně v neuronech, ale i v gliových buňkách. Zvýšená exprese mTOR zvětšuje dendritické větvení a snižuje denzitu dospělých dendritických vláken. V CNS dospělého člověka je mTOR zásadní pro synaptickou plasticitu a zároveň tak dlouhodobou potenciaci, čímž hraje důležitou roli v procesu učení a paměti. Ve starším mozku je mTOR důležitý zejména v regulaci proteostázy pomocí regulace translace a autofagie, čímž se snaží vyhnout akumulaci toxických proteinových agregátů, které by mohly být příčinou neurodegenerace. Protein mTOR je zahrnutý v řadě procesů týkajících se neurálních funkcí, a proto je na mTOR pohlíženo jako na terapeutický cíl. Potenciální dlouhověkosti by se dalo dosáhnout redukcí mTOR signalizace např. pomocí rapamycinu, který je jeho specifickým inhibitorem. Několik studií potvrdilo schopnost rapamycinu zlepšit určité funkce běžně ovlivněné stářím, na druhé straně však další studie nevykazovaly žádné změny [61, 62].

Protein mTOR má dva funkčně i strukturně odlišné komplexy – komplex mTOR 1 (mTORC1) a komplex mTOR 2 (mTORC2). Oba tyto komplexy obsahují podjednotku smrtící pro savce se sec13 proteinem 8 (mLST8) a protein interagující s mTOR obsahující doménu Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin - DEP (Deptor), který je negativním regulátorem mTOR. Zvýšená exprese Deptor způsobuje sníženou aktivitu obou komplexů. Komplex mTORC1 dále obsahuje dva specifické proteiny: s regulátorem asociovaný protein mTOR (Raptor), který je klíčový pro aktivaci komplexu; a na prolin bohatý Akt substrát (PRAS40), který je negativním regulátorem mTORC1. Komplex mTORC2 naopak obsahuje 3 proteiny klíčové pro správnou funkci: na rapamycin-necitlivý společník mTOR (Rictor), savčí stresem-aktivovanou proteinkinázu (mSin1) a protein pozorovaný s Rictor (Protor) Strukturu obou komplexů popisuje obr. 13 [62, 63].



Obrázek 13: Schéma struktury mTORC1 a mTORC2. mTOR – savčí cíl rapamycinu, mTORC1/2 – komplex mTOR, PRAS40 – na prolin bohatý Akt substrát, Deptor - mTOR obsahující doménu Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin – DEP, Raptor – s regulátorem asociovaný protein mTOR, mLst8 – podjednotka smrtící pro savce se sec13 proteinem 8, Rictor – na rapamycin-necitlivý společník mTOR, mSin1 – stresem-aktivovaná proteinkináza, Protor - protein pozorovaný s Rictor. Převzato z: [64].

Komplex mTORC1 aktivuje hormony CNS, neuromodulátory a neurotransmitery. Jeho aktivita je ovlivňována růstovými faktory, AMK, energetickými hladinami, dostupností glukózy a působením stresorů. Komplex mTORC2 kontroluje organizaci cytoskeletu a buněčné přežití. Přestože úloha mTOR v AD není zcela prozkoumána, důkazy poukazují na sníženou produkci A β vlivem mTOR. Agregace A β také vede k hyperaktivaci mTOR, který dále hyperfosforyluje protein Tau, což vede k tvorbě párových helikálních filament a k tvorbě neurofibrilárních klubek. Aktivita mTOR je u pacientů AD velmi vysoká a některé studie ukazují, že aktivace mTOR zvyšuje patologii spojenou s Tau proteinem vedoucí k dysfunkci autofagie. Hlavním pojítkem mezi Nrf2 a mTOR je ARE sekvence v promotorové oblasti mTOR, která váže Nrf2 a ten tak přímo reguluje expresi tohoto genu. Ač u PD také pozorujeme změnu signalizace mTOR, jeho přesná funkce je zatím nejasná [62].

Protein mTOR patří společně s proteinkinázou B (PKB, někdy také označována jako Akt) a proteinem tuberózní sklerózy 2 (TSC2) mezi hlavní komponenty signální dráhy fosfatidylnositol-3-kinázy (PI3K). Již bylo dokázáno, že Nrf2 nepřímo reguluje členy dráhy PI3K a ačkoliv v buňkách s fyziologickou aktivitou PI3K dochází po zvýšení hladiny Nrf2 k vyšší hladině mTOR, není jasné, zda se jedná o regulaci na transkripční nebo proteinové úrovni. Další studie ukázaly, že Nrf2 nepřímo zvyšuje hladinu mTOR pomocí zvýšení exprese RagD proteinu, který je znám jako aktivátor mTOR. Nrf2 dále

reguluje melanogenezi v lidských melanocytech, a to přímou modulací aktivity komponent dráhy PI3K, včetně Akt a mTOR [65].

Aktivace PI3K nastává prostřednictvím mutace Ras, ztrátou PTEN nebo zvýšenou expresi růstových faktorů. Aktivace této dráhy je opatrně kontrolována několika kroky. Aktivované receptory přímo stimulují PI3K třídy 1A prostřednictvím regulační podjednotky nebo adaptorových molekul, jako jsou např. proteiny substrátu inzulinového receptoru (IRS). To následně spustí aktivaci PI3K a konverzi z lipidů fosfatidylinositol (3,4)-bifosfátových (PIP₂) na fosfatidylinositol (3,4,5)-trifosfát (PIP₃). Poté se PKB/Akt váže na PIP₃ na plazmatické membráně, čímž umožní přístup 3-fosfoinositid-dependentní proteinkinázy 1 (PDK1), která fosforyluje T308 v aktivační smyčce. To vede k částečné aktivaci PKB/Akt. Takto částečně aktivovaná PKB/Akt dále aktivuje mTORC1 pomocí inaktivace PRAS40 a TSC2. Plně aktivní PKB/Akt řídí řadu funkcí, včetně angiogeneze, metabolismu, růstu, proliferace, přežití, transkripce i apoptózy [66, 67].

3.4 Úloha Nrf2 v reparaci tkání

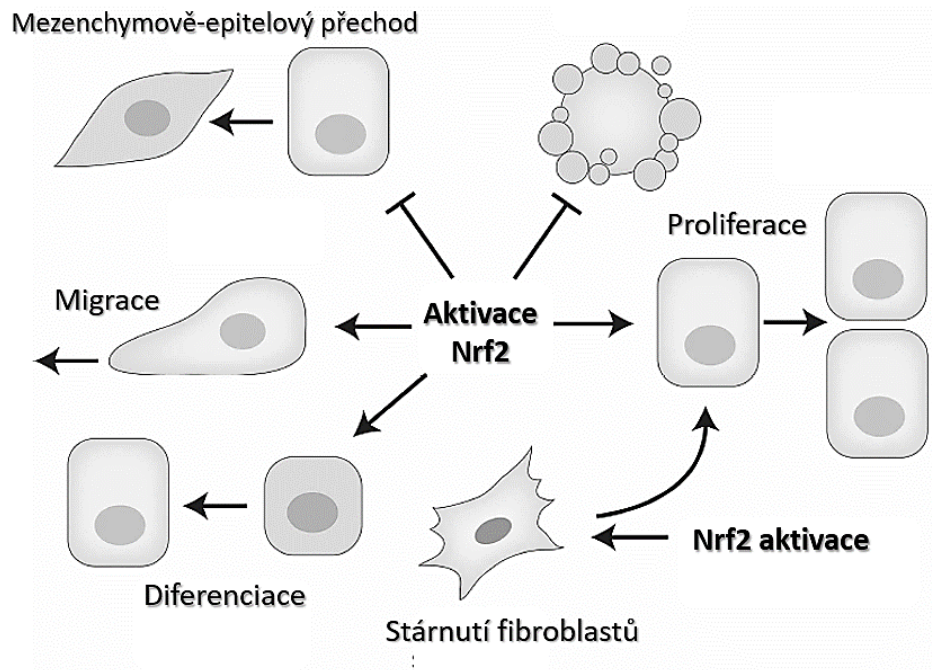
Za běžných podmínek se proces hojení a reparace tkáně skládá z řady fází, počínaje hemostázou a tvorbou fibrinové zátky. Brzy poté začíná zánětlivá fáze, kdy do místa nastupují neutrofilové a další složky imunitního systému, jako jsou lymfocyty a makrofágy. Během toho dochází také k produkci cytokinů a růstových faktorů, což do místa láká fibroblasty, stimuluje migraci a proliferaci keratinocytů na tvorbu nových cév. Zde může začít fáze tvorby tkáně během hojící fáze. Během této fáze může docházet k různým defektům, které mohou mít výrazné následky a mohou vést např. chronickým nehojícím se ranám, nebo dokonce k infekci, hospitalizaci až smrti. Genová exprese během reparace tkáně je řízena různými TF, které tak řídí procesy v místě hojení. Jedním z těchto TF je i cytoprotektivní Nrf2 [68].

Rány produkují velké množství ROS jako obranu proti patogenům. Zvýšená exprese Nrf2 nastává po vzniku poranění souběžně s produkcí ROS a během progresu hojení se postupně se snižuje. Nrf2 je dále silně exprimován keratinocyty hyperproliferativního epitelu a buňkami granulační tkáně. Několik studií testovalo sloučeniny aktivující Nrf2 (NO a dárci NO), které se nacházejí např. v jedu včel, olivovém oleji, či jiných rostlinných extraktech tohoto druhu. Účinky těchto sloučenin jsou různé a mají různé způsoby působení, proto lze přesnou roli Nrf2 z těchto studií jen těžko usoudit. Ztráta Nrf2 vede u myši v místě zranění ke zpožděné indukci, ale také k prodloužené zvýšené expresi prozánětlivých cytokinů a perzistenci makrofágů. Mezi

ovlivněné cytokiny patřil např. transformující růstový faktor β 1, jehož zpoždění na začátku hojení vede ke snížené produkci kolagenu. Kinetika reakcí hojení je však v případě odstranění Nrf2 nezměněná, což může být alespoň částečně způsobeno kompenzačním působením jiných TF, např. Nrf1 a Nrf3 [68, 69].

Ač je role Nrf2 důležitá, jeho samotná funkce může být v některých případech nadbytečná, např. u běžného hojení ran bez dalších vedlejších problémů. Tato teorie byla testována u diabetického modelu myši, u kterých bylo pozorováno významné snížení rychlosti hojení rány oproti běžným myším. U diabetického modelu myši s odstraněním Nrf2 došlo ještě k většímu zpomalení hojení rány. Z toho vyplývá, že role Nrf2 je důležitější v patologických situacích, jako například při Diabetu mellitu. Nedostatek Nrf2 dále zhoršuje hojení zlomenin a snižuje expresi antioxidantních enzymů v osteoblastech. Řada růstových faktorů, jako je fibroblastový růstový faktor, inzulinový růstový faktor 1 a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), hraje důležitou roli v modulaci buněčné odpovědi během hojení zlomenin. VEGF podporuje zvýšenou oxygenaci v místě poranění a iniciuje neovaskularizaci. VEGF také aktivuje Nrf2 a zvyšuje hladinu některých antioxidantních enzymů, např. HO-1, thioredoxin reduktáza (TrxR) a thioredoxin (Trx). Aktivace Nrf2 dále indukuje expresi HO-1, který katalyzuje konverzi hemu na oxid uhelnatý a volné železo, čímž chrání před toxicitou hemu [68, 69, 70].

Aktivace Nrf2 ve fibroblastech vede ke stárnutí těchto buněk. To je žádaný efekt během procesu opravy tkáně, protože tyto buňky dále poskytují další molekulární podněty sousedním buňkám. Fibroblasty s aktivním Nrf2 dále uvolňují faktory, které přímo podporují proliferaci keratinocytů v epidermis zranění a podporují re-epitelizaci. Aktivace Nrf2 se tak projevuje zvýšenou proliferací epiteliálních buněk, zvýšeným stárnutím fibroblastů vedoucím ke zvýšené proliferaci sousedních buněk, dále podporuje epiteliální diferenciaci a migraci, redukuje mezenchymově-epitelový přechod a následnou fibrózu a v neposlední řadě také chrání buňku před apoptózou, viz. obr. 14 [70].



Obrázek 14: Buněčné procesy regulované Nrf2. Nrf2 – nukleární erytroidní faktor. Převzato z: [70].

4 Úloha Nrf2 v buněčné smrti

Nrf2 aktivuje širokou škálu genů, včetně proteinů zahrnutých v thioredoxinovém a glutathionovém systému. Oba tyto systémy závisejí na přítomnosti selenoproteinů v aktivní části enzymů, které se dále podílejí na redukci oxidačního stresu a na programované buněčné smrti [35].

4.1 Detoxikační enzymy

Detoxikační enzymy hrají zásadní roli při udržování homeostázy, a to zdůrazňují programy buněčné smrti, které jsou spojené s regulací těchto enzymů. Selenoproteiny jsou proteiny obsahující ve své struktuře stopový prvek selen a tvoří tak selenomethioniny a selenocysteiny. V játrech může být selen katalyzován na anorganické sloučeniny selenát a selenid. Vzhledem k stopové koncentraci selenu v organismu je exprese proteinů obsahujících selen regulována v závislosti na potřebách a dostupnosti selenu. Příkladem enzymů, které obsahují selen je GPx, který katalyzuje redukci či oxidaci různých substrátů, například peroxidu vodíku a oxidovaných lipidů, a TrxR, která se účastní recyklace oxidovaných thioredoxinů, které byly použity k redukci oxidovaných proteinů. Exprese selenoproteinů je úzce spojena s redoxním stavem a deficit selenu aktivuje dráhu Nrf2. Experimenty prokázaly, že nedostatek selenu v potravě způsobil zvýšenou expresi 48 genů závislých na Nrf2, mezi které patří antioxidantní enzymy a detoxikační enzymy fáze II [35].

4.1.1 Stopové prvky

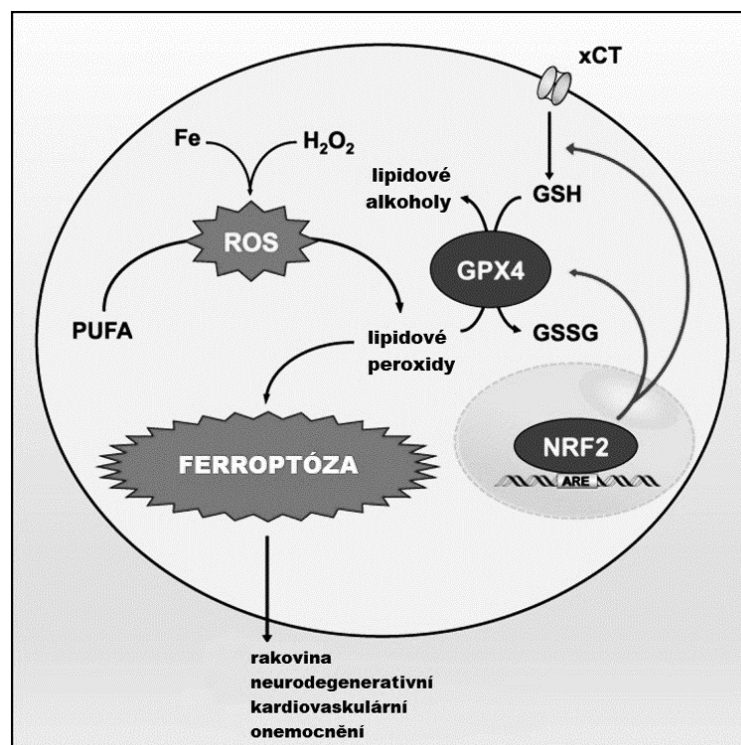
Esenciální stopové prvky mají svou nezastupitelnou roli v enzymatických reakcích, a to pro jejich redox-modulační vlastnosti. Mezi tyto prvky řadíme například měď, zinek, železo a selen. Jestliže se vyskytují v nadbytku, nebo ve formě volných nevázaných iontů, mohou se chovat jako pro-oxidanty. V opačném případě jsou antioxidantní a protektivní enzymy, jako jsou selenoproteiny, GPx, TrxR, Cu/Zn SOD a kataláza, závislé na přítomnosti konkrétních stopových prvků. Stopové prvky ovlivňují redoxně modulované signální dráhy, mezi které patří signální dráha Nrf2. Například navázání zinku spouští konformační změnu v Keap1, čímž dochází k stabilizaci Nrf2 a k jeho přesunu do jádra, kde aktivuje cílové geny. Zinek navíc moduluje aktivitu několika kináz a fosfatáz, které zvyšují aktivitu Nrf2. Pokusy také ukázaly, že zvýšená hladina Fe v játrech zvýšila aktivitu Nrf2 a ten dále chránil jaterní buňky před toxicitou zvýšeného množství Fe

z potravy pomocí přecházení buněčné smrti hepatocytů a podpory vyloučení Fe. V neposlední řadě může Nrf2 ovlivnit také spoustu transportních a vazajících proteinů, například během zánětu dochází k efluxu Fe z makrofágů a enterocytů ferroportinem, nebo může indukovat také hepcidin a ferritin [71].

4.2 Ferroptóza

Ferroptóza je regulovaná buněčná smrt, která je řízena peroxidací fosfolipidů. Buňka je chráněna před ferroptózou pomocí Gpx4, která používá GSH k eliminaci fosfolipidových peroxidů. Gpx4 je centrálním inhibítozem ferroptózy obsahující selen, jehož přítomnost tento děj tlumí. Iniciace ferroptózy je často způsobena lipoxygenázami, které způsobují výskyt peroxidů lipidů a fungují tak opačně oproti Gpx4. Cytochrom P450 oxidoreduktáza je hnacím motorem peroxidace lipidů během ferroptózy. K ukládání železa (Fe^{III}) v inertní podobě slouží ferritin, díky kterému železo nemůže přispívat k peroxidaci lipidů, a proto je množství ferritinu důležitým faktorem regulujícím citlivost k ferroptóze. Nezávisle na Gpx4 a tedy i GSH může docházet k inhibici pomocí ferroptóзовého supresorového proteinu 1, který blokuje peroxidaci lipidů a potlačuje ferroptózu regenerací redukovaného koenzymu Q_{10} . Gen náchylnosti k rakovině prsu (BRCA1)-asociovaný protein 1 (BAP1) je tumorovým supresorem, který je schopen podpořit ferroptózu potlačením *SLC7A11*, který zprostředkovává Na^+ -nezávislý příjem cystinu výměnou za glutamát a patří mezi Nrf2 aktivované antioxidační geny. Inaktivace BAP1 vede ke zvýšení exprese transportéru *SLC7A11*, rezistenci k ferroptóze a vývoji rakoviny. *SLC7A11* interaguje přímo s 12-lipooxygenázou a inhibuje jeho aktivitu. Adenosindifosfát (ADP)-ribosylační faktor (ARF) je hlavním regulátorem funkce p53 a i inhibuje acetylaci Nrf2, čímž potlačuje jeho transkripční aktivitu. Exprese ARF zvyšuje citlivost buněk k ferroptóze, naopak jeho deplece indukuje aktivaci Nrf2, což má za následek podporu přežití rakovinových buněk a Nrf2 je tak důležitým terapeutickým cílem při supresi nádorů pomocí ARE. Exprese *SLC7A11* je přísně regulována onkoproteiny a tumorovými supresory (ARF, p53, BAP1) a může být užitečným biomarkerem ferroptózy [72].

Peroxidace lipidů má tři kroky: iniciaci, propagaci a terminaci. Během iniciace dochází k oddělení atomu vodíku z vazby na allylový uhlík zejména v polynenasycených mastných kyselinách nacházejících se v membránách vlivem ROS, RNS a reaktivních forem lipidů a tím dojde k vytvoření lipidového radikálu. Propagace začíná reakcí lipidového radikálu s kyslíkem tvořící peroxylový radikál, který může dále oddělit allylový uhlík za vzniku nového lipidového radikálu a peroxidu lipidů. Terminace je krok, při kterém se setkají dva lipidové či peroxylové radikály, nebo endogenní antioxidanty (GSH, vitamin E) darují atom vodíku k tvorbě neradikálového produktu. Peroxidy lipidů, které vznikly během propagace, mohou být dále redukovány pomocí GPx na lipidové alkoholy, nebo degradovány na hydroxy mastné kyseliny a reaktivní aldehydy. Vzniklé reaktivní lipidové radikály mohou dále iniciovat peroxidaci, modifikovat klíčové proteiny a nebo způsobit toxicitu a tím iniciovat kaskádu buněčné smrti. Při akumulaci těchto peroxidů lipidů a jejich degradačních produktů dochází k iniciaci ferroptózy, viz. obr. 15. Řada proteinů a enzymů zodpovědných za prevenci peroxidace lipidů, jsou cílovými geny Nrf2 [73, 74].



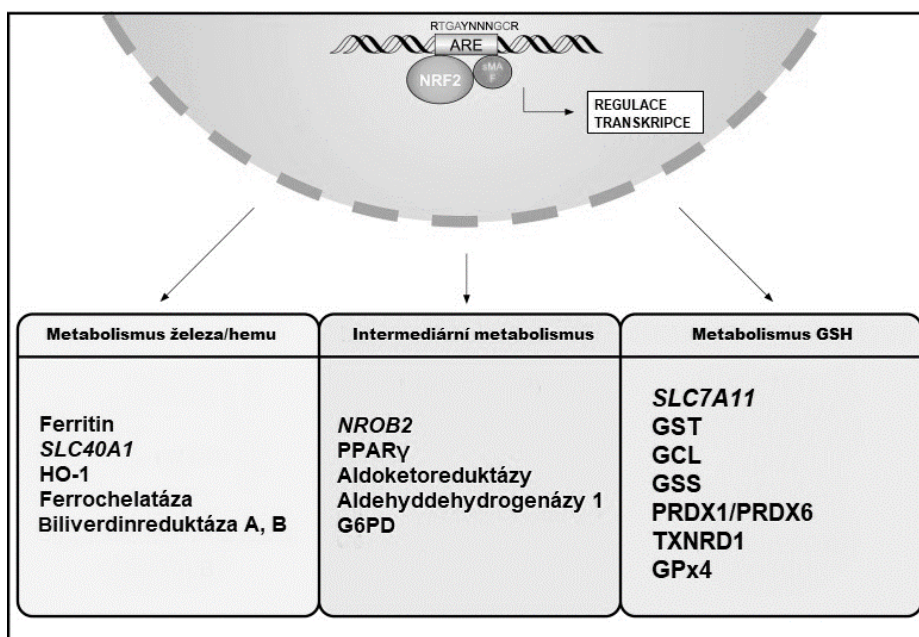
Obrázek 15: Ferroptóza. ROS – reaktivní formy kyslíku, PUFA – polynenasycené mastné kyseliny, GPx4 – glutathion peroxidáza 4, GSH – redukovaný glutathion, GSSG – oxidovaný glutathion, xCT – cystein-glutamát transportér. Převzato z: [73].

4.2.1 Funkce Nrf2 v ferroptóze

Nrf2 ovlivňuje ferroptózu ve třech oblastech. První oblastí je metabolismus železa/hemu. Zde ovlivňuje ferritin, který je klíčovým proteinem skladujícím Fe a ferroportin (*SLC40A1*), který zodpovídá za eflux železa z buňky ven. Dále ovlivňuje enzym HO-1, který katalyzuje přeměnu hemu na biliverdin, a ferrochelátázu, která je důležitou komponentou syntézy hemu. V neposlední řadě se podílí i na regulaci biliverdin reduktázy A a B [73, 75].

Druhou oblastí účinku Nrf2 je intermediární metabolismus. Cílové geny Nrf2 jsou zahrnuty v metabolismu lipidů a ovlivňují zde nukleární receptor 0B2 (NROB2), receptor gamma aktivovaný peroxisomovým proliferátorem (PPAR γ). Cílové geny se dále podílejí na redukci aldehydů a ketonů na alkoholy (aldoketoreduktázy), oxidaci aldehydů na karboxylové kyseliny (aldehyd dehydrogenázy 1 A1) a také na metabolismu glukózy a v regeneraci NADPH (glukózo-6-fosfát dehydrogenáza) [76, 77].

Poslední oblastí působnosti Nrf2 je metabolismus GSH, kde Nrf2 ovlivňuje GCL, GSS, podjednotku cystein/glutamát transportéru xCT (*SLC7A11*), GST, PRDX 1 a 6, TrxR a GPx4. Všechny oblasti účinku Nrf2 jsou shrnuty v obr. 16 [73, 78].



Obrázek 16: Cílové geny Nrf2 zahrnuty ve ferroptóze. HO-1 – hemoxygenáza 1, NROB2 – nukleární receptor podrodiny 0 skupiny B člen 2, PPAR γ - peroxizomovým proliferátorem aktivovaný receptor γ , G6PD – glukózo-6-fosfát dehydrogenáza, GST- glutathion-S-transferáza, GCL - γ -glutamátcysteinligáza, GSS – glutathionsyntetáza, PRDX1/6 – peroxiredoxin 1/6, TXNRD1 – thioredoxin reduktáza 1, GPx4 – glutathion peroxidáza 4. Převzato z: [73].

4.3 Apoptóza

Apoptóza je programovaná buněčná smrt. Je to proces, který nastává přirozeně v průběhu stárnutí buňky a je homeostatickým mechanismem, který udržuje buněčnou populaci tkání. Může být ale také ochranným mechanismem během imunitních reakcí při poškození buněk nemocí, či škodlivými činiteli. Obdobou apoptózy je nekróza, která je ale považována za degradační proces nastávající po buněčné smrti. Ačkoliv se mechanismus a morfologie těchto dvou procesů liší, jsou oba zahrnuty v takzvaném apoptoticky-nekrotickém kontinuu. Buňka procházející apoptózou může snadno přejít do nekrózy vlivem malé dostupnosti kaspáz a intracelulárního ATP a jestli buňka nakonec umírá apoptózou nebo nekrozou, to záleží na typu signálu buněčné smrti, na typu a vývoji tkáně a také na fyziologickém prostředí. Proto není snadné tyto dva procesy odlišit, mohou navíc probíhat současně v závislosti na intenzitě a trvání stimulu, rozsahu deplece ATP a přítomnosti kaspáz. Apoptóza je indukovaná velkým počtem různých stimulů, které jsou charakteristické postupnou aktivací konkrétních cest a mechanismů, které vedou ke specifickým biochemickým a morfologickým změnám v buňce bez zahájení zánětlivé odpovědi. Časná fáze apoptózy je charakteristická iniciací aktivace kaspáz, sražením buňky, ztráty asymetrie membránových lipidů a kondenzací chromatinu. V realizační fázi pak dochází k vlastní aktivaci kaspáz, endonukleáz, formaci apoptotických tělísek a fragmentaci buňky [19, 79].

4.3.1 Funkce Nrf2 v apoptóze

Nrf2 dokáže inhibovat řadu regulátorů buněčné smrti, mezi které patří například proapoptotické Bax proteiny a kaspázy, a to prostřednictvím zvýšení exprese Bcl-xL. Nrf2 může také zvyšovat antiapoptotický protein Bcl-2, čímž chrání buňky před Fas-indukovanou apoptózou. Absence Nrf2 pak může vyústit v poškození a dysfunkci buněk. Citlivost buněk k poškození je částečně důsledkem snížené transkripce detoxikačních elementů zahrnující GSH a enzym GCL, respektive jeho katalytickou podjednotku GCLC. GSH pak hraje zásadní roli v udržování redoxního stavu zbytků thiolových proteinů včetně NF- κ B, kaspáz a stresem-zprostředkovaných kináz, které jsou zahrnuty v TNF-indukované apoptóze. Deplece GSH je výrazným faktorem apoptózy, jenž způsobí zvýšení ROS a snížení aktivity GCL. Apoptóza v hepatocytech je zprostředkována indukcí receptorů smrti Fas a TNF- α a pokusy ukázaly, že snížení Nrf2 má za následek masivní hepatotoxicitu. Naopak zvýšení hladin Nrf2 způsobilo akumulaci

GSH a tím i útlum oxidačního stresu a poškození buněk. Je pravděpodobné, že signalizační dráhy NF-κB a Nrf2 spolupracují na udržování redoxní homeostázy a na následné protizánětlivé odpovědi. Nrf2 snižuje intracelulární ROS a tím inhibuje redoxně-regulovanou aktivaci NF-κB. Na druhou stranu, NF-κB má vazebnou oblast v promotorové oblasti Nrf2 a ten může být pomocí NF-κB represován [80].

Rodina proteinů Bcl-2 se skládá z více než šesti antiapoptotických členů a podílí se na regulaci buněčné smrti a přežití. Zvýšená exprese proteinů Bcl-2 je často asociována se špatnou prognózou v řadě typů rakoviny. Přesný mechanismus funkce těchto proteinů není přesně znám, ačkoliv bylo dokázáno, že stabilizace Nrf2 zprostředkovaná H₂S zvyšovala hladinu Bcl-2 u myši, což mělo za následek kardioprotektivní efekt. V promotorové oblasti reverzního vlákna Bcl-2 se nachází ARE, na který se může vázat Nrf2 a tím dokáže regulovat expresi a indukovat gen Bcl-2. To má za následek zvýšenou regulaci antiapoptotického Bcl-2 a zároveň sníženou regulaci proapoptotických Bcl-2-asociovaných X proteinů, uvolnění cytochromu C z mitochondrií a aktivaci kaspáz. Nrf2 tak hraje důležitou roli inhibici apoptózy a zvyšuje buněčné přežití [81].

4.3.2 PERK-dependentní aktivace Nrf2

Akumulace nesložených proteinů může vyvolat odpověď, která spustí obě signalizační dráhy – jak dráhu pro přežití, tak dráhu pro apoptózu. Nrf2 se podílí na udržení hladiny GSH, který dále působí jako tzv. nárazník při akumulaci ROS během odpovědi na nesložené proteiny. Inhibice produkce ROS navíc tlumí indukci apoptózy, která by nastala vlivem stresu ER. Poruchy v udržování redoxní rovnováhy buňky pak senzibilizují buňky k účinkům stresu ER. Buňky mají signalizační dráhu, která rozpozná akumulaci nesložených protein, tzv. *unfolded protein response* (UPR). Ta se skládá ze tří příbuzných transmembránových proteinkináz (inositol-vyžadující enzymy Ire1α, Ire1β a *protein kinase-like ER kinase* = PERK), transmembránového transkripčního faktoru ATF6 a z transmembránové proteázy kaspázy-12. Tyto složky spolu vzájemně kooperují během buněčné reakce následující po aktivaci UPR. UPR-dependentní aktivace PERK brání translaci proteinů prostřednictvím inhibice eukaryotického translačního iniciačního faktoru 2 (eIF2). Po aktivaci UPR totiž následuje fosforylace eIF2, která tlumí translaci většiny buněčných proteinů, ale zároveň podporuje zvýšenou translaci vybraných proteinů, jako je například aktivační transkripční faktor 4 (ATF4) a pro-apoptotický transkripční faktor C/EBP homologní protein (CHOP). Tento regulační program translace je kritický pro homeostázu nejen buněk, ale i organismu. PERK-dependentní signály

vyvolávají aktivaci transkripčního faktoru Nrf2. Výzkumy ukázaly, že při nedostatku Nrf2 v buňkách dochází ke zvýšené citlivosti k apoptóze a sníženému přežití buňky v po podání tunicamycinu, což potrhuje důležitou roli Nrf2 pro přežití buňky během stresu ER. Tento stres ER indukuje transkripci GCLC a NQO1, které jsou jako prekurzory součástí GSH syntézy. Jejich indukce je závislá jak na Nrf2, tak i na PERK. Aktivace Nrf2 na začátku stresu ER poskytuje buňce ochranu prostřednictvím produkce GSH ve snaze čelit účinkům stresu ER, avšak dlouhotrvající stresová reakce je pro buňku tak škodlivá, že dochází k apoptotické smrti [82].

U buněk s nedostatečnou UPR signalizací je pozorována zvýšená oxidační zátěž, o čemž vypovídá i vysoká produkce ROS a nízká intracelulární hladina GSH. Deplece GSH pak výrazně zvyšuje UPR-dependentní buněčnou smrt, což pouze zvýrazňuje důležitost redoxní rovnováhy během stresového působení ER. Samotná akumulace ROS v buňkách negativních na Nrf2 však nestačí pro indukci apoptózy, je třeba dalšího stresového stimulu. Je pravděpodobné, že produkce ROS buňku pouze připravuje na buněčnou smrt a funguje tak jako signál k zahájení apoptózy [82].

PERK významně snižuje výskyt apoptózy u buněk indukovaných ischemickou reperfúzí (IR). Nadměrná exprese Nrf2 i HO-1 snižuje apoptotický index u myší, avšak při podání HO-1 dochází ke snížení efektů upregulace PERK, což naznačuje klíčovou roli kaskády Nrf2/HO-1 v PERK-řízených obranných procesech srdce. Během IR také dochází ke zvýšení hladin kreatin kinázy typu MB (CK-MB) a laktátdehydrogenázy (LDH) v krevním oběhu a při zvýšení exprese PERK, Nrf2 a HO-1 se hladiny CK-MB a LDH snižují, což opět potvrzuje snížení poškození vzniklé vlivem IR. U buněk indukovaných IR dále dochází ke zvýšení exprese glukózou-regulovaného proteinu 78 (GRP78), C-reaktivního proteinu a proapoptických faktorů zprostředkovaných stresem endoplazmatického retikula (ERS faktorů) – včetně CHOP a kaspázy 12. Po ošetření buněk PERK dochází ke snížení exprese GRP78, C-reaktivního proteinu, CHOP a kaspázy 12. IR významně zvyšuje proapoptickou aktivitu kaspázy 12, ale zvýšením PERK a následnou aktivací Nrf2 a HO-1 dochází k prevenci zvýšení aktivity kaspázy 12. Z toho vyplývá, že mechanismy závislé na upregulaci Nrf2/HO-1, kterými došlo ke snížení poškození srdce vyvolané IR, fungují na principu inhibice apoptotické aktivity regulované stresem ER [83].

Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá transkripčním faktorem Nrf2. Je zaměřena převážně na popis jeho funkce ve vztahu k glutathionu, kterému je věnována úvodní část práce. Glutathion je významnou antioxidační molekulou, který má důležitou roli v ochraně buněk před volnými radikály a ROS, v detoxikaci škodlivých molekul a také se podílí na regulaci apoptózy, a to právě udržováním rovnováhy ROS v buňce. Nrf2 reguluje expresi široké škály antioxidačních a detoxikačních genů, mezi které patří i právě ty, které se podílejí na syntéze a recyklaci glutathionu v buňce. Tyto geny kódují enzymy podílející se na jeho syntéze (GCL), enzymy zahrnuté v detoxikačních procesech glutathionu (GST) a enzymy udržující antioxidační kapacitu (GR). Spolupráce Nrf2 a glutathionu je kritická pro buněčné obranné mechanismy buněk proti oxidačnímu stresu, což umožňuje udržení redoxní rovnováhy a podporu zdraví a dlouhého přežití buňky.

Hlavní část práce je zaměřena na funkci Nrf2 v buněčné smrti. Jeho zapojení v regulaci buněčné smrti je komplexní záležitostí. Aktivací Nrf2 dochází k ochraně buňky před buněčnou smrtí indukovanou oxidačním stresem a toxiny, a to upregulací exprese antioxidačních enzymů a detoxikačních proteinů, které působí proti efektům ROS a dalším signálům, které přispívají k indukci buněčné smrti. Nrf2 dále moduluje aktivitu jak proapoptotických a protiapoptotických faktorů, a tím obecně přispívá k ochraně buňky před apoptózou. Moduluje také řadu enzymů zodpovědných za prevenci peroxidace lipidů u ferroptózy. Dále interaguje s různými signalizačními dráhami, které se podílí na regulaci buněčné smrti, jako je např. NF- κ B, což může ovlivnit osud buňky různými směry. Aktivace Nrf2 je pro své antioxidační a cytoprotektivní účinky obecně považována za prospěšnou, avšak dlouhodobá aktivace může přispívat k nežádoucí odolnosti vůči buněčné smrti, např. při chemoterapii.

Použitá literatura

- [1] FORMAN, Henry, Hongqiao ZHANG a Alessandra RINNA. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009, 30(1-2), 1-12. DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.006.
- [2] Compound Summary for CID 124886, Glutathione. In: PubChem [online]. US: National Library of Medicine, 2005 [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutathione>.
- [3] VAŠKOVÁ, Janka. Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. *Molecules*. 2023, 283(1447), 1-22. DOI: 10.3390/molecules28031447.
- [4] WATANABE, Fumiko, Erika HASHIZUME, Gertrude CHAN a Ayako KAMIMURA. Skin-whitening and skin-condition-improving effects of topical oxidized glutathione: a double-blind and placebo-controlled clinical trial in healthy women. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2014, 7(1), 267-274. DOI: 10.2147/CCID.S68424.
- [5] JAGANJAC, Morana, Lidija MILKOVIC, Suzana SUNJIC a Neven ZARKOVIC. The NRF2, Thioredoxin, and Glutathione System in Tumorigenesis and Anticancer Therapies. *Antioxidants (Basel)*. 2020, 9(11), 1-26. DOI: 10.3390/antiox9111151.
- [6] LU, Shelly C. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013, 1830(5), 3143–3153. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
- [7] GALANT, Ashley, Mary PREUSS, Jeffrey CAMERON a Joseph JEZ. Plant glutathione biosynthesis: diversity in biochemical regulation and reaction products. *Frontiers in Plant Science*. 2011, 2(45), 1-7. DOI: 10.3389/fpls.2011.00045.
- [8] BACHHAWAT, Anand Kumar. The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the γ -glutamyl cycle. *IUBMB Life*. 2018, 70(7), 585-592. DOI: 10.1002/iub.1756.
- [9] FRANKLIN, Christopher. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009, 30(1-2), 86-98. DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.009.

- [10] DEPONTE, Marcel. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013, 1830(5), 3217-3266. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.09.018.
- [11] MARGIS, Rogerio, Christophe DUNAND, Felipe TEIXEIRA a Marcia MARGIS-PINHEIRO. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *The FEBS Journal*. 2008, 275(15), 3959-3970. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x.
- [12] XIONG, Ying, Joachim UYS, Kenneth TEW a Danyelle TOWNSEND. S-Glutathionylation: From Molecular Mechanisms to Health Outcomes. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2011, 15(1), 233-270. DOI: 10.1089/ars.2010.3540.
- [13] ALAMU, Olufemi, Mariam RADO, David FISHER a Okobi EKPO. Differential Sensitivity of Two Endothelial Cell Lines to Hydrogen Peroxide Toxicity: Relevance for In Vitro Studies of the Blood–Brain Barrier. *Cells*. 2020, 9(2), 1-13. DOI: 10.3390/cells9020403
- [14] RAJPUT, Vishnu, HARISH, Rupesh SINGH et al. Recent Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress. *Biology (Basel)*. 2021, 10(4), 1-30. DOI: 10.3390/biology10040267.
- [15] ZHUGE, Xiang-Lin, Hui XU, Zhi-Jing XIU a Hai-Ling YANG. Biochemical Functions of Glutathione S-Transferase Family of *Salix babylonica*. *Frontiers in Plant Science*. 2020, 11(364), 1-11. DOI: 10.3389/fpls.2020.00364.
- [16] LU, Shelly C. Regulation of Glutathione Synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009, 30(1-2), 42-59. DOI: 10.1016/j.mam.2008.05.005.
- [17] AOYAMA, Koji a Toshio NAKAKI. Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1). *Molecules*. 2015, 20(5), 8742-8758. DOI: 10.3390/molecules20058742.
- [18] CIRCU, Magdalena a Tak AW. Glutathione and apoptosis. *Free Radical Research*. 2011, 42(8), 689-706. DOI: 10.1080/10715760802317663.
- [19] FRANCO, R. a J. CIDLOWSKI. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death & Differentiation*. 2009, 16(1), 1303–1314. DOI: 10.1038/cdd.2009.107.

- [20] LU, Meng-Chen, Jian-Ai JI, Zheng-Yu JIANG a Qi-Dong YOU. The Keap1-Nrf2-ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. *Medicinal Research Reviews*. 2016, 6(5), 924-963. DOI: 10.1002/med.21396.
- [21] CUADRADO, Antonio, Ana ROJO, Geoffrey WELLS et al. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2019, 18(4), 295-317. DOI: 10.1038/s41573-018-0008-x.
- [22] LAMBERT, Samuel, Arttu JOLMA, Laura CAMPITELLI et al. The Human Transcription Factors. *Cell*. 2018, 172(4), 650-665. DOI: 10.1016/j.cell.2018.01.029.
- [23] SNUSTAD, Peter a Michael SIMMONS. Principles of genetics. 6th. John Wiley & Sons. 2011. ISBN 978-1118129210.
- [24] LAITY, John, Brian LEE a Peter WRIGHT. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*. 2001, 11(1), 39-46. DOI: 10.1016/s0959-440x(00)00167-6.
- [25] RAZIN, S., V. BORUNOVA, O. MAKSIMENKO a O. KANTIDZE. Cys2His2 zinc finger protein family: classification, functions, and major members. *Biochemistry (Moscow)*. 2012, 77(3), 217-226. DOI: 10.1134/S0006297912030017.
- [26] HAN, Guoliang, Chaoxia LU, Jianrong GUO, Ziqi QIAO, Na SUI, Nianwei QIU a Baoshan WANG. C2H2 Zinc Finger Proteins: Master Regulators of Abiotic Stress Responses in Plants. *Frontiers in Plant Science*. 2020, 11(115), 1-13. DOI: 10.3389/fpls.2020.00115.
- [27] RELIGA, Tomasz, Christopher JOHNSON, Dung VU, Scott BREWER, Richard DYER a Alan FERSHT. The helix-turn-helix motif as an ultrafast independently folding domain: The pathway of folding of Engrailed homeodomain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, 104(22), 9272-9277. DOI: 10.1073/pnas.0703434104.
- [28] ANANTHARAMAN, Archana, I-Ju LIN, Joeva BARROW, Shermi LIANG, Jude MASANNAT, John STROUBOULIS, Suming HUANG a Jörg BUNGERT. Role

- of helix-loop-helix proteins during differentiation of erythroid cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2011, 31(7), 1332-1343. DOI: 10.1128/MCB.01186-10.
- [29] LATCHMAN, David S. Transcription factors: An overview. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1997, 29(12), 1305-1312. DOI: 10.1016/s1357-2725(97)00085-x.
- [30] CHRAMOSTOVÁ, Kamila. Model pro studium regulace transkripce granulocytárních genů MPO a MMP9 rozdílnými koncentracemi transkripčního faktoru PU.1. 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie. Vedoucí práce Pospíšil, Vít.
- [31] TONELLI, Claudia, Iok CHIO a David TUVESON. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants and redox signaling*. 2018, 29(17), 1727-1745. DOI: 10.1089/ars.2017.7342.
- [32] YAMAMOTO, Masayuki, Thomas KENSLER a Hozumi MOTOHASHI. The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiological Reviews*. 2018, 98(3), 1169-1203. DOI: 10.1152/physrev.00023.2017.
- [33] ISHIKAWA, Makie, Satoshi NUMAZAWA a Takemi YOSHIDA. Redox regulation of the transcriptional repressor Bach1. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005, 38(1), 1344-1352. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.01.021.
- [34] KANG, Tae-Cheon. Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) and Mitochondrial Dynamics, Mitophagy in Neurological Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2020, 9(7), 1-44. DOI: 10.3390/antiox9070617.
- [35] JENKINS, Tabitha a Jerome GOUGE. Nrf2 in Cancer, Detoxifying Enzymes and Cell Death Programs. *Antioxidants (Basel)*. 2021, 10(7). DOI: 10.3390/antiox10071030.
- [36] YU, Chao a Jian-Hui XIAO. The Keap1-Nrf2 System: A Mediator between Oxidative Stress and Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021, 2021(6635460), 1-16. DOI: 10.1155/2021/6635460.

- [37] JAIN, Ashish, Trond LAMARK, Terje JOHANSEN et al. P62/SQSTM1 Is a Target Gene for Transcription Factor NRF2 and Creates a Positive Feedback Loop by Inducing Antioxidant Response Element-driven Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285(29), 22576-22591. DOI: 10.1074/jbc.M110.118976.
- [38] KWAK, Mi-Kyoung, Masayuki YAMAMOTO, Ken ITOH a Thomas KENSLER. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the Nrf2 promoter. *Molecular and Cellular Biology*. 2002, 22(9), 2883-2892. DOI: 10.1128/MCB.22.9.2883-2892.2002.
- [39] HE, Feng, Xiaoli RU a Tao WEN. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(4777), 1-23. DOI: 10.3390/ijms21134777.
- [40] LI, Robert, Zhenquan JIA a Hong ZHU. Regulation of Nrf2 Signaling. *The Reactive Oxygen Species (Apex)*. 2019, 8(24), 312-322. DOI: 10.20455/ros.2019.865.
- [41] ZIMTA, Alina-Andreea, Diana CENARIU, Alexandru IRIMIE, Lorand MAGDO, Seyed NABAVI, Atanas ATANASOV a Ioana BERINDAN-NEAGOE. The Role of Nrf2 Activity in Cancer Development and Progression. *Cancers (Basel)*. 2019, 11(11), 16. DOI: 10.3390/cancers11111755.
- [42] YUAN, Huan, Yan XU, Yi LUO, Nuo-Xin WANG a Jian-Hui XIAO. Role of Nrf2 in cell senescence regulation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2021, 476(1), 247–259. DOI: 10.1007/s11010-020-03901-9.
- [43] HOLMSTRÖM, Kira, Rumen KOSTOV a Albena DINKOVA KOSTOVA. The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Current Opinion in Toxicology*. 2016, 1(1), 80-91. DOI: 10.1016/j.cotox.2016.10.002.
- [44] DINKOVA-KOSTOVA, Albena a Andrey ABRAMOV. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015, 88(1), 179–188. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036.

- [45] ULASOV, Alexey, Andrey ROSENKRANZ, Georgii GEORGIEV a Alexander SOBOLEV. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation. *Life Sciences*. 2022, 291(120111), 1-12. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.12011.
- [46] SAHA, Sarmistha, Brigitta BUTTARI, Emiliano PANIERI, Elisabetta PROFUMO a Luciano SASO. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules*. 2020, 25(22), 1-31. DOI: 10.3390/molecules25225474.
- [47] ZHANG, Meijuan, Chengrui AN, Yanqin GAO, Rehana LEAK, Feng ZHANG a Jun CHEN. Emerging Roles of Nrf2 and Phase II Antioxidant Enzymes in Neuroprotection. *Progress in Neurobiology*. 2012, 100(1), 30-47. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2012.09.003.
- [48] KOBAYASHI, Eri, Takafumi SUZUKI, Ryo FUNAYAMA et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature Communications*. 2016, 7(11624), 1-14. DOI: 10.1038/ncomms11624.
- [49] THIMMULAPPA, Rajesh, Catherine SCOLLICK, Kassim TRAORE, Melinda YATES a Michael TRUSH. Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006, 351(4), 883-889. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.10.102.
- [50] WANG, Jang-Shiun, Feng-Ming HO, Hao-Cheng KANG, Wan-Wan LIN a Kuo-Chin HUANG. Celecoxib induces heme oxygenase-1 expression in macrophages and vascular smooth muscle cells via ROS-dependent signaling pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2011, 383(2), 159-168. DOI: 10.1007/s00210-010-0586-6.
- [51] JIAN, Zhe, Lingzhen TANG, Xiuli YI et al. Aspirin induces Nrf2-mediated transcriptional activation of haem oxygenase-1 in protection of human melanocytes from H₂O₂-induced oxidative stress. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2016, 20(7), 1307-1318. DOI: 10.1111/jcmm.12812.

- [52] STAURENGO-FERRARI, Larissa, Stephanie BADARO-GARCIA, Scott POPE, Miriam HOHMANN, Marília MANCHOPE, Tiago ZANINELLI, Rubia CASAGRANDE a Waldiceu VERRI JR. Contribution of Nrf2 Modulation to the Mechanism of Action of Analgesic and Anti-inflammatory Drugs in Pre-clinical and Clinical Stages. *Frontiers in Pharmacology*. 2019, 9(1536), 1-43. DOI: 10.3389/fphar.2018.01536.
- [53] VENUGOPAL, R. a A. JAISWAL. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene*. 1998, 17(24), 3145-3156. DOI: 10.1038/sj.onc.1202237.
- [54] KEUM, Young-Sam. Regulation of Nrf2-Mediated Phase II Detoxification and Anti-oxidant Genes. *Biomolecules & Therapeutics*. 2012, 20(2), 144-151. DOI: 10.4062/biomolther.2012.20.2.144.
- [55] SANDBERG, Mats, Jaspal PATIL, Barbara D'ANGELO, Stephen WEBER a Carina MALLARD. NRF2-regulation in brain health and disease: implication of cerebral inflammation. *Neuropharmacology*. 2014, 79(1), 298-306. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.11.004.
- [56] JEMBREK, Maja, Nada ORŠOLIĆ, Lucija MANDIĆ, Anja SADŽAK a Suzana ŠEGOTA. Anti-Oxidative, Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Effects of Flavonols: Targeting Nrf2, NF-κB and p53 Pathways in Neurodegeneration. *Antioxidants (Basel)*. 2021, 10(10), 1-28. DOI: 10.3390/antiox10101628.
- [57] BREIJYEH, Zeinab a Rafik KARAMAN. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 2020, 25(24), 1-15. DOI: 10.3390/molecules25245789.
- [58] ZGORZYNSKA, Emilia, Barbara DZIEDZIC a Anna WALCZEWSKA. An Overview of the Nrf2/ARE Pathway and Its Role in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(17), 1-16. DOI: 10.3390/ijms22179592.

- [59] OSAMA, Alsiddig, Junmin ZHANG, Juan YAO, Xiaojun YAO a Jianguo FANG. Nrf2: a dark horse in Alzheimer's disease treatment. *Ageing Research Reviews*. 2020, 64(101206), 1-17. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101206.
- [60] PARGA, Juan, Ana RODRIGUEZ-PEREZ, Maria GARCIA-GARROTE, Jannette RODRIGUEZ-PALLARES a Jose LABANDEIRA-GARCIA. NRF2 Activation and Downstream Effects: Focus on Parkinson's Disease and Brain Angiotensin. *Antioxidants (Basel)*. 2021, 10(11), 1-29. DOI: 10.3390/antiox10111649.
- [61] PERLUIGI, Marzia, Fabio DOMENICO a D. BUTTERFIELD. MTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy. *Neurobiology of Disease*. 2015, 84(1), 39-49. DOI: 10.1016/j.nbd.2015.03.014.
- [62] ZOUNGRANA, Linda, Meredith KRAUSE-HAUCH, Hao WANG et al. The Interaction of mTOR and Nrf2 in Neurogenesis and Its Implication in Neurodegenerative Diseases. *Cells*. 2022, 11(13), 1-15. DOI: 10.3390/cells11132048.
- [63] GUREEV, Artem, Vasily POPOV a Anatoly STARKOV. Crosstalk between the mTOR and Nrf2/ARE signaling pathways as a target in the improvement of long-term potentiation. *Experimental Neurology*. 2020, 328(113285), 1-8. DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113285.
- [64] TAKAHARA, Terunao, Yuna AMEMIYA, Risa SUGIYAMA, Masatoshi MAKI a Hideki SHIBATA. Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes. *Journal of Biomedical Science*. 2020, 27(87), 1-16. DOI: 10.1186/s12929-020-00679-2.
- [65] BENDAVID, Gabriel, Tahar ABOULKASSIM, Khalid HILMI, Sujay SHAH a Gerald BATIST. Nrf2 Transcription Factor Can Directly Regulate mTOR. *Journal of Biological Chemistry*. 2016, 291(49), 25476–25488. DOI: 10.1074/jbc.M116.760249.

- [66] HEMMING, Brian a David RESTUCCIA. PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012, 4(9), 1-3. DOI: 10.1101/cshperspect.a026609 .
- [67] KARAR, Jayashree a Amit MAITY. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2011, 4(51), 1-15. DOI: 10.3389/fnmol.2011.00051.
- [68] HIEBERT, Paul a Sabine WERNER. Regulation of Wound Healing by the NRF2 Transcription Factor—More Than Cytoprotection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, 20(16), 1-16. DOI: 10.3390/ijms20163856.
- [69] SÜNTAR, Ipek, Sümeýra ÇETINKAYA, Emiliano PANIERI, Sarmistha SAHA, Brigitta BUTTARI, Elisabetta PROFUMO a Luciano SASO. Regulatory Role of Nrf2 Signaling Pathway in Wound Healing Process. *Molecules*. 2021, 26(9), 1-25. DOI: 10.3390/molecules26092424
- [70] HIEBERT, Paul a Sabine WERNER. Targeting NRF2 to promote epithelial repair. *Biochemical Society Transactions*. 2023, 51(1), 101–111. DOI: 10.1042/BST20220228.
- [71] SCHWARZ, Maria, Kristina LOSSOW, Johannes KOPP, Tanja SCHWERDTLE a Anna KIPP. Crosstalk of Nrf2 with the Trace Elements Selenium, Iron, Zinc, and Copper. *Nutrients*. 2019, 11(9), 1-18. DOI: 10.3390/nu11092112.
- [72] STOCKWELL, Brent, Xuejun JIANG a Wei GU. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis. *Trends in cell biology*. 2020, 30(6), 478-490. DOI: 10.1016/j.tcb.2020.02.009.
- [73] DODSON, Matthew, Raul CASTRO-PORTUGUEZ a Donna ZHANG. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Antioxidants and Redox Singaling*. 2018, 29(17), 1756-1773. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101107.
- [74] HIGDON, Ashlee, Anne DIERS, Joo OH, Aimee LANDAR a Victor DARLEY-USMAR. Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochemical Journal*. 2012, 442(3), 453-464. DOI: 10.1042/BJ20111752.

- [75] AGYEMAN, Abena, Raghothama CHAERKADY, Patrick SHAW, Nancy DAVIDSON, Kala VISVANATHAN, Akhilesh PANDEY a Thomas KENSLER. Transcriptomic and Proteomic Profiling of KEAP1 Disrupted and Sulforaphane Treated Human Breast Epithelial Cells Reveals Common Expression Profiles. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2012, 132(1), 175-187. DOI: 10.1007/s10549-011-1536-9.
- [76] JUNG, Kyeong-Ah, Bo-Hyun CHOI, Chang-Won NAM, Mingu SONG, Sang-Tae KIM, Joo LEE a Mi-Kyoung KWAK. Identification of aldo-keto reductases as NRF2-target marker genes in human cells. *Toxicology Letters*. 2013, 218(1), 39-49. DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.12.026.
- [77] CHO, Hye-Youn, Wesley GLADWELL, Xuting WANG, Brian CHORLEY, Douglas BELL, Sekhar REDDY a Steven KLEEBERGER. Nrf2-regulated PPAR{gamma} expression is critical to protection against acute lung injury in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010, 182(2), 170-182. DOI: 10.1164/rccm.200907-1047OC.
- [78] KERINS, Michael a Aikseng OOI. The Roles of NRF2 in Modulating Cellular Iron Homeostasis. *Antioxidants and Redox Singaling*. 2018, 29(17), 1756-1773. DOI: 10.1089/ars.2017.7176.
- [79] ELMORE, Susan. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*. 2007, 35(4), 495-516. DOI: 10.1080/01926230701320337.
- [80] GHANIM, Bayan a Nidal QINNA. Nrf2/ARE axis signalling in hepatocyte cellular death. *Molecular Biology Reports*. 2022, 49(5), 1-15. DOI: 10.1007/s11033-022-07125-6.
- [81] NITURE, Suryakant a Anil JAISWAL. Nrf2 Protein Up-regulates Antiapoptotic Protein Bcl-2 and Prevents Cellular Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, 287(13), 9873–9886. DOI: 10.1074/jbc.M111.312694.

- [82] CULLINAN, Sara a J. DIEHL. PERK-dependent Activation of Nrf2 Contributes to Redox Homeostasis and Cell Survival following Endoplasmic Reticulum Stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279(19), 20108–20117. DOI: 10.1074/jbc.M314219200.
- [83] WANG, Jichun, Li LU a Hong JIANG. Up-regulation of PERK/Nrf2/HO-1 axis protects myocardial tissues of mice from damage triggered by ischemia-reperfusion through ameliorating endoplasmic reticulum stress. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*. 2020, 10(3), 500-511. DOI: 10.21037/cdt-20-126.