

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

KEAP1-NRF2 oksüdatiivse stressi vastusrada aktiveerivate induktorite võrdlev analüüs

Magistritöö

Geenitehnoloogia

Mai-Brit Tänava

30 EAP

Juhendajad

Vanemteadur Ivar Ilves, PhD

Teadur Nele Tamberg, PhD

TARTU 2019

KEAP1-NRF2 oksüdatiivse stressi vastusrada aktiveerivate induktorite võrdlev analüüs

Üheks oluliseks oksüdatiivse stressi vastaseks kaitsemehhanismiks rakus on stressi ära tundev ja sellele vastavalt detoksifitseerivaid ja kaitsvaid geene aktiveeriv KEAP1-NRF2 signaalrada (Itoh *et al.*, 1999). Käesoleva töö eesmärgiks oli paika panna optimaalsed tingimused antud raja aktivatsiooniks koekultuuri rakkudes. Selle tarbeks võrreldi erinevaid stressi induktoreid, peaaesjalikult H₂O₂, tBHQ ja DEM-i, seda nii erinevatel inkubatsiooniaegadel kui ka erinevates rakuliinides. Töö tulemustest selgus, et endogeenset oksüdatiivset stressi hästi mimikeeriva H₂O₂-e efekt NRF2-e stabiliseerimisele on kiire ja lühiajaline, samal ajal kui kehavõõraste ühendite tBHQ ja DEM-i efekt on pikemaajalisem ja püsivam. Meie uurimisrühma edasisteks KEAP1-NRF2 raja aktiveerimise katseteks sobiks kõige paremini ksenobiootikumid nagu tBHQ või DEM, optimaalseks inkubatsiooniajaks oleks 2–6 tunni vahemik ning selgeimate tulemustega rakuliiniks HaCat. H₂O₂-te võiks induktorina kasutada vaid madalates kontsentratsioonides ja lühikese inkubatsiooniaja vältel.

Märksõnad: NRF2, KEAP1, oksüdatiivne stress, H₂O₂, ksenobiootikumid

CERCS kood: B200 Tsütoloogia, onkoloogia ja kantseroloogia

Comparative analysis of inducers activating the oxidative stress pathway of KEAP1-NRF2

One of the primary protective mechanisms against oxidative stress in the cell is the KEAP1-NRF2 signaling pathway (Itoh *et al.*, 1999). The aim of this study was to establish optimal requirements for the activation of that pathway under *in vitro* conditions. To achieve this, various oxidative stress inducers were compared both at different incubation times and in different cell lines. Main comparison was between H₂O₂ and xenobiotics tBHQ and DEM. The results of this study revealed that the effect of H₂O₂ on the stabilization of NRF2 is rapid and short-lived, while the effect of tBHQ and DEM is slower, more long-lasting and stable. Based on this, the best suited stress inducers for further KEAP1-NRF2 pathway activation experiments by our group are xenobiotics such as tBHQ or DEM, with an optimal incubation time of 2–6 hours. Best fitted cell line would be HaCat. H₂O₂ might only be considered as an oxidative stress inducer at low concentrations and in a short incubation period.

Keywords: NRF2, KEAP1, oxidative stress, H₂O₂, xenobiotics

CERCS code: B200 Cytology, oncology, and carciniology

SISUKORD

| | |
|--|----|
| KASUTATUD LÜHENDID | 5 |
| SISSEJUHATUS | 8 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 10 |
| 1.1. Oksüdatiivne stress | 10 |
| 1.1.1. Oksüdatiivse stressi KEAP1-NRF2 signaalrada..... | 11 |
| 1.1.2. KEAP1 valgu domeenid ja reaktiivsed tsüsteiinijäägid | 13 |
| 1.1.3. NRF2 valgu domeenid ja stabiliseerumine..... | 15 |
| 1.2. DNA kahjustuste vastane kaitse | 18 |
| 1.3. Eksogeense vesinikperoksiidi kasutamine oksüdatiivse stressi indutseerimiseks.... | 19 |
| 2. EKSPERIMENTAALNE OSA | 22 |
| 2.1. Töö Eesmärgid..... | 22 |
| 2.2. Materjalid ja meetodika..... | 22 |
| 2.2.1. Töös kasutatud rakuliinide kasvatamine koekultuuris..... | 22 |
| 2.2.2. Oksüdatiivset stressi ja proteasoomi inhibitsiooni indutseerivad ühendid..... | 23 |
| 2.2.3. Rakkude kogumine, lüüsimine ja fraktsioneerimine | 23 |
| 2.2.4. <i>Western blot</i> analüüs..... | 25 |
| 2.3. Tulemused | 26 |
| 2.3.1. Eksogeense vesinikperoksiidi efekt NRF2-e aktiveerimisele on kiire ja pöörduv..... | 26 |
| 2.3.2. tBHQ ja DEM-i efekt NRF2-e aktivatsioonile on aeglane ja püsiv | 28 |
| 2.3.3. CHK kinaaside ja KEAP1-NRF2 poolt kontrollitavad oksüdatiivse stressi vastusrajad on üksteisest sõltumatud..... | 31 |
| 2.3.4. Stabiliseerudes lokaliseerub NRF2 kasutatud induktorist hoolimata üle kogu raku..... | 35 |
| 2.4. Arutelu | 37 |
| KOKKUVÕTE | 42 |
| SUMMARY..... | 43 |

| | |
|-------------------------|----|
| KIRJANDUSE LOETELU..... | 45 |
| TÄNUSÕNAD | 54 |
| LIHTLITSENTS..... | 55 |

KASUTATUD LÜHENDID

ATM – ataksia telangiiektaasia muteeritud kinaas (ingl *ataxia telangiectasia mutated*)

ATR – ATM-Rad3-sarnane kinaas (ingl *ATM-Rad3-related*)

ARE – antioksidantne vastuse element (ingl *antioxidant response element*)

BTB – KEAP1 domeen (ingl *Broad-Complex, Tramtrack, and Bric a` brac*)

β -TrCP – β -transdutsiini sisaldav valk (ingl *β -transducin repeat-containing protein*)

BSA - veise seerumi albumiin (BSA, ingl *Bovine Serum Albumin*)

CDK – tsükliinsõltuv kinaas (ingl *cyclin-dependent protein kinase*)

CEB – tsütoplasmaatilise ekstrakti eralduspuhver (ingl *Cytoplasmic Extraction Buffer*)

ChBNE – kromatiiniga seotud tuuma ekstrakt (ingl *chromatin bound nuclear extract*)

CHK1 – kontrollpunkt kinaas 1 (ingl *checkpoint kinase 1*)

CHK2 – kontrollpunkt kinaas 2 (ingl *checkpoint kinase 2*)

CPE – tsütoplasmaatiline ekstrakt (ingl *cytoplasmic extract*)

CTR – C-terminaalne regioon (ingl *C-terminal region*)

CUL3 – kulliin 3 (ingl *cullin 3*)

CySk – tsütoskeleti fraktsioon (ingl *cytoskeleton*)

Cys – tsüsteiinijääk (ingl *cysteine*)

DDR – DNA kahjustuste vastane kaitserada (ingl *DNA Damage Response*)

DEM – dietüülmaleaat

DMEM – Dulbecco modifitseeritud raku sööde (ingl *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DPP3 – dipeptidüül peptidaas 3 (ingl *dipeptidyl peptidase 3*)

DSB – DNA kaheaheelalised katked (ingl *DNA double strand breaks*)

E3 – ubikvitiin-proteiin ligaas

HaCat – keratinotsüütide püsirakuliin (ingl *human adult, low calcium, high temperature*)

HEK293 – inimese embrüonaalsetest neerurakkudest eraldatud rakuliin (ingl *human embryonic kidney*)

HPEK – inimese primaarsed epidermaalsed keratinotsüüdid (ingl *human primary epidermal keratinocytes*)

IVR – vahepealne regioon (ingl *intervening region*)

KEAP1 – Kelch sarnane ECH seotud valk 1 (ingl *Kelch-like ECH associated protein 1*)

DGR – KEAP1 topelt glütsiini kordus domeen (ingl *double glycine repeat*)

MAF – transkriptsioonifaktor, V-maf muskuloaponeurootilise fibrosarkoomi onkogeeni homoloog (ingl *V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*)

MCM3 – minikromosoomi säilitamise kompleksi komponent 3 (ingl *Minichromosome Maintenance Complex Component 3*)

ME – membraani ekstrakt (ingl *membrane extract*)

MEB – membraanse ekstrakti eralduspuhver (ingl *Membrane Extraction Buffer*)

MG132 – 26S proteasoomi inhibitor, karbobensoksü-Leu-Leu-leutsiin (ingl *carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal*)

Neh – NRF2-ECH homoloogia domeenid (ingl *NRF2-ECH homology*)

NES – tuuma ekspordi signaal (ingl *nuclear export signal*)

NEB – tuumse ekstrakti eralduspuhver (ingl *Nuclear Extraction Buffer*)

NLS – tuuma lokalisatsiooni signaal (ingl *nuclear localization signal*)

NTR – N-terminaalne regioon (ingl *N-terminal region*)

NRF2 – NF-E2 p45-seotud faktor 2 (ingl *NF-E2 p45-related factor 2*)

PALB2 – BRCA2 partner ja lokaliseerija (ingl *partner and localizer of BRCA2*)

PEB – sademe eralduspuver (ingl *Pellet Extraction Buffer*)

PVDF – polüvinülideenfluoriid

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid (ingl *reactive oxygen species*)

RPA – replikatsiooni valk A (ingl *replication protein A*)

RXR α – retinoosne X retseptor α (ingl *retinoic X receptor α*)

SDS – naatrium dodetsüülsulfaat (ingl *sodium dodecyl sulfate*)

SNE – lahustuva tuuma ekstrakt (ingl *soluble nuclear extract*)

tBHQ – *tert*-butüülhüdrokinoon (ingl *tert-butylhydroquinone*)

WDR1 – WD kordusi sisaldav valk 1 (ingl *WD Repeat-Containing Protein 1*)

3-AT – 3-amino-1,2,4-triasool

SISSEJUHATUS

Rakud puutuvad pidevalt kokku mitmesuguste endogeensete ja eksogeensete stressoritega, mis võivad kahjustada rakulisi struktuure ja funktsioone ning potentsiaalselt ohustada ka raku ellujäämist. Üheks oluliseks sellise stressi allikaks on reaktiivsed hapnikuühendid (ingl *reactive oxygen species*, ROS), mis tekivad nii normaalse elutegevuse käigus kui ka kehavõõraste ehk ksenobiootiliste mõjurite tulemusel (Hensley *et al.*, 2000). ROS-ide hulk organismis on reguleeritud antioksidantsete regulatsioonisüsteemide poolt. Kui need süsteemid on ülekoormatud, siis tasakaal oksüdatiivsete mõjurite ja antioksidantide vahel läheb paigast ära ning tekib oksüdatiivne stress (Kovacic & Jacintho, 2001; Valko *et al.*, 2006). KEAP1-NRF2 vastusrada on üheks peamiseks kaitsemehhanismiks vastusena oksüdatiivsele ja ksenobiootilisele stressile (Itoh *et al.*, 1999). See baseerub redoks-tundliku KEAP1-e ja oksüdatiivse stressi eest kaitsvate geenide ekspressiooni initsieeriva transkriptsioonifaktori, NRF2-e, interaktsioonil (Itoh *et al.*, 1999). Tavaolekus hoiab sensorvalk KEAP1 oma interaktsioonipartneri taseme madalal suunates seda pidevasse degradatsiooni ratta, stressiseisundis KEAP1 aga vabastab NRF2-e, mis võimaldab viimasel stabiliseeruda akumulieruda ning lõpuks ka tuuma translokeeruda (Itoh *et al.*, 1999; Dinkova-Kostova *et al.*, 2002).

Antud uurimistöö peamiseks eesmärgiks oli välja selgitada, millised võiksid olla optimaalsed eeldused ja tingimused KEAP1-NRF2 oksüdatiivse stressi vastusraja aktivatsiooni uurimiseks koekultuuri rakkudes. Täpsemalt võeti luubi alla erinevate mõjurite kasutus ning peamiselt võrdlus endogeenselt leitava vesinikperoksiidi (H₂O₂) ja erinevate ksenobiootiliste induktorite vahel. H₂O₂-e kasutus huvitas meid seetõttu, et kuigi tegemist on ühe paremini kirjeldatud oksüdatiivse stressi induktorina, on teda KEAP1-NRF2 raja uurimiseks kasutatud vaid vähesel määral ning erinevates teaduslikes töödes kasutatavad tingimused on olnud üsna vastuolulised. Induktorite võrdlusel lähtuti peamiselt NRF2-e aktivatsiooni ajalisest dünaamikast, rakuliinide erinevusest, stabiliseerunud NRF2-e lokaliseerumise muutustest ja DNA kahjustuste vastase kaitseraja aktiveerimisest. Suuremas plaanis on meil soov siduda KEAP1-NRF2 rada genoomi replikatsiooni regulatsiooniga, milles mängib olulist rolli helikaasikompleks MCM2–7 (Tsai *et al.*, 2015). On leitud, et antud kompleksi üks liige (MCM3) interakteerub samuti KEAP1-ga (Hast *et al.*, 2013).

Teades, kuidas optimaalselt aktiveerida KEAP1-e peamist interaktsioonipartnerit, NRF2-te, on võimalik paremini planeerida ka edasisi katseid KEAP1-MCM3 interaktsiooni rolli uurimiseks.

Käesolev magistritöö valmis Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis vanemteadur Ivar Ilvese juhendamisel.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

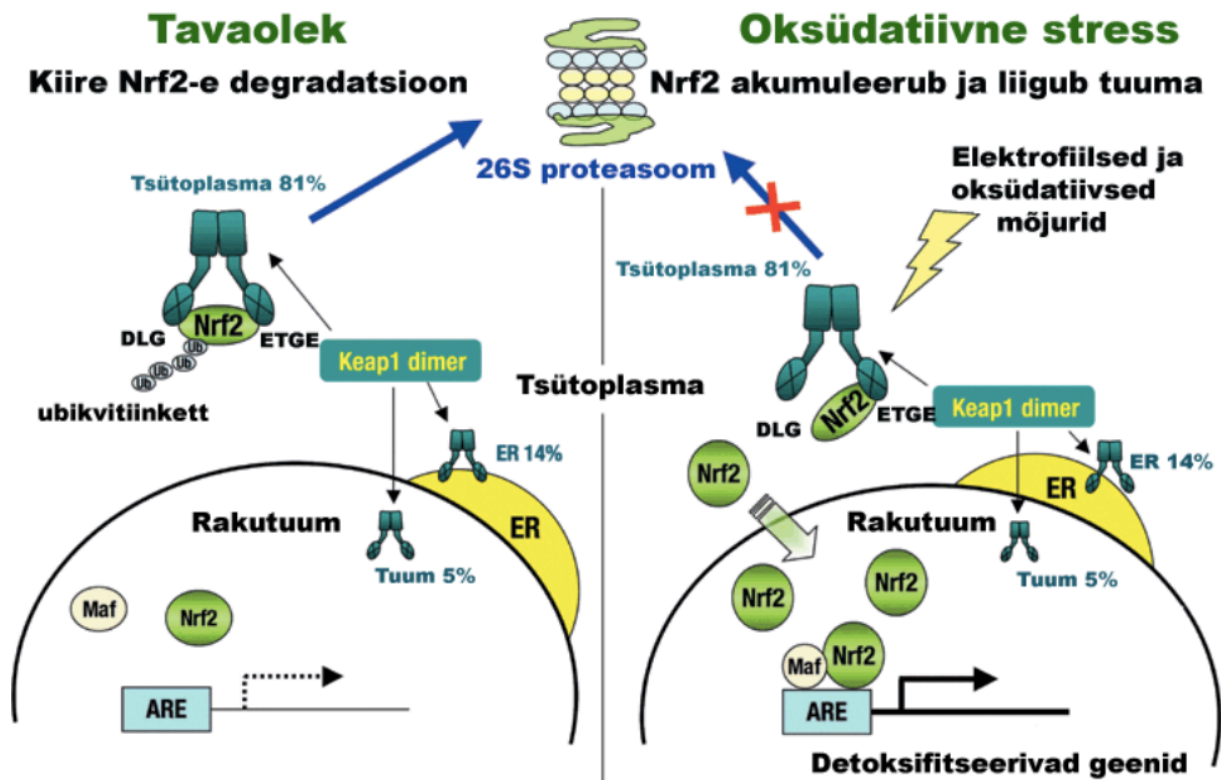
1.1. Oksüdatiivne stress

Aeroobse metabolismi kõrvalproduktina ja erinevate redoks signaalradade tulemusel tekib rakus pidevalt suur hulk oksüdeerivaid ühendeid, mis on võimelised väga aktiivselt reageerima rakusiseste biomolekulidega. Enamlevinud rakusisesed oksüdandid on reaktiivsed hapnikuühendid (ROS), nendeks on näiteks superoksiidi anioon ($\bullet\text{O}_2^-$), hüdroksüülradikaal ($\bullet\text{OH}$), hüdroperoksüülradikaal ($\text{HOO}\bullet$) ja vesinikperoksiid (H_2O_2) (Hensley *et al.*, 2000). Füsioloogilistes tingimustes tekib ROS-e piisavalt madalates kontsentratsioonides, et olla pidevalt tasakaalustatud rakusiseste antioksidatiivsete kaitsemehhanismide kaudu. Mitte-ensümaatilised antioksidandid on näiteks askorbiinhape ehk C-vitamiin, A-tokoferool ehk E vitamiin ja glutatioon (Dröge, 2002; Valko *et al.*, 2006). Ensümaatilised kaitsemehhanismid on näiteks superoksiidi dismutaas, katalaas ja glutatiooni peroksüdaas, mis koos teiste kaitseradadega tegelevad pideva neutraliseerimisega ja tagavad rakusise homoöstaasi (Dröge, 2002; Valko *et al.*, 2006). Madalates kontsentratsioonides toovad ROS-id rakule isegi kasu vahendades signaali ülekannet ja aktiveerides kaitsemehhanisme või stimuleerides kasvu signaale (Forman *et al.*, 2002; Dröge, 2002; Valko *et al.*, 2006). Rakusiseste oksüdantide ja ksenobiootikumide järjepidev kõrge tase võib aga viia raku redoks tasakaalu paigast ära, mille korral pole raku antioksidatiivsed süsteemid enam võimelised reaktiivseid hapnikuühendeid neutraliseerima ning tekib oksüdatiivne stress (Kovacic & Jacintho, 2001; Valko *et al.*, 2006). ROS-ide tase rakus võib tõusta üle läve nii rakusiseste kui ka rakuväliste protsesside kaudu. Rakuvälised ROS-ide tekitajad on näiteks radioaktiivne kiirgus, ultraviolettkiirgus, ultraheli, raskemetallid, ksenobiootikumid toidus ja kosmeetikas, antioksidantide taset langetavad ravimid, keskkonnamürgid jpm. Rakusiseselt tekib ROS-e peroksüsoomides, mitokondriaalse hingamisahela kõrvalproduktina ja ülearustes kogustes näiteks NAD(P)H oksüdaasi ülestimulatsiooni kaudu (Kovacic *et al.*, 2005; Bedard & Krause, 2007; Valko *et al.*, 2007). Lühiajalisest oksüdatiivsest stressist on rakud enamasti võimelised taastuma ja tekkivad kahjustused on pöörduvad, pikaajaline ja väga tugev stress käib rakkudele aga üle jõu ja põhjustab pöördumatuid kahjustusi ning võib rakud viia ka püsivasse kasvu peatumisse või kontrollitud rakusurma ehk apoptoosi (Martindale & Holbrook, 2002; Valko *et al.*, 2006). Kõrgenenud kontsentratsioonides ROS-id kahjustavad kas otse või kaudselt nukleiinhape, süsivesikute, lipiidide ja valkude struktuuri ja funktsioone. DNA-d võivad vabad radikaalid kahjustada mitmeti, kas tekitades ühe- või kaheahelilisi katkeid, puriini, pürimidiini või desoksoribonukleotiidide modifikatsioone või

DNA ristsidemeid (Berquist & Wilson, 2012). Erinevad DNA kahjustused kutsuvad esile replikatsiooni vigu, genoomset ebastabiilsust, erinevate signaaliradade häirumist, transkriptsiooni aresti või hoopis aktivatsiooni (Valko *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2007). Sellised kahjustused soodustavad rakkude vananemist ja erinevaid neurodegeneratiivseid haigusi ning võivad oma genotoksiliste efektide kaudu vallandada ka rakkude onkogeense transformeerumise (Valko *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2007).

1.1.1. Oksüdatiivse stressi KEAP1-NRF2 signaalrada

Rakus on hulganisti erinevaid kaitsesüsteeme, mis aktiveeruvad vastusena nii endogeensetele kui ka väliskeskkonnast tulenevatele oksüdatiivsetele ja elektrofiilsetele rünnakutele ja algatavad mitmesuguste detoksifitseerivate ja antioksidantsete geenide transkriptsiooni või erinevaid reparatsiooniga seotud signaalradu. Üheks selliseks süsteemiks on oksüdatiivse stressi sensorvalgu KEAP1-e (ingl *Kelch-like ECH associated protein 1*) ning tema poolt kontrollitava transkriptsioonifaktori NRF2-e (ingl *NF-E2 p45-related factor 2*) interaktsioonil tuginev signaalrada (Itoh *et al.*, 1999) (Joonis 1). KEAP1 on tsüsteiinirikas sensorvalk, mis tunneb ära oksüdatiivseid ja elektrofiilseid molekule ja sellele vastavalt reguleerib kaitsevastust esilekutsuva transkriptsioonifaktori NRF2-e aktiivsust (Itoh *et al.*, 1999; Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Wakabayashi *et al.*, 2004). Normaalolekus hoiab KEAP1 oma interaktsioonipartneri taseme madalal suunates iga uuesti sünteesitud NRF2 molekuli proteasomaalsele lagundamisele läbi CUL3-E3 ubikvitiinligaas kompleksi (Zhang *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2004). Stressi tingimustes aga reageerivad oksüdandid või elektrofiilid KEAP1-e reaktiivsete tsüsteiinijääkidega ning põhjustavad konformatsioonilisi muutusi, mille tulemusel ei ole KEAP1 enam võimeline temaga seotud NRF2 molekule lagundamisele saatma (Itoh *et al.*, 1999; Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Wakabayashi *et al.*, 2004). Põhidogma kohaselt paikneb KEAP1 peamiselt vaid tsütosoolis ning vastavalt oma asukohale ankurdab endaga seotud oleva NRF2-e tsütoskeletile (Kobayashi *et al.*, 2005; Watai *et al.*, 2007; Iso *et al.*, 2016). Uuemad teadustööd on aga leidnud KEAP1 valku teataval hulgal ka tuumas (Watai *et al.*, 2007), ning omistanud KEAP1-le võime tuuma ja tsütoplasma vahel liikuda (Buckley *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2011). Kindlalt on aga välja selgitatud NRF2 valgu võime tsütoplasma ja tuuma vahel liikuda läbi tema C-terminuses asuva tuuma lokalisatsiooni- (ingl *nuclear localization signal*, NLS) ja tuuma ekspordisignaali (*nuclear export signal*, NES) (Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). Kuna stressi olukorras interaktsioon KEAP1-e ja *de novo* sünteesitud NRF2-e vahel on blokeeritud, saavad vastsünteesitud NRF2 valgud tsütoplasmas stabiliseeruda ja seejärel tuuma translokeeruda (Kobayashi *et al.*, 2005).



Joonis 1. KEAP1-NRF2 signaalrada rakus. Tavaolekus on KEAP1 NRF2-ga tugevalt seotud läbi NRF2-e koostises oleva ETGE ja DLG motiivi ning suunab NRF2 valku degradatsioonile 26S proteosoomis. Elektrofiilse, oksüdatiivse või ksenobiootilise stressi korral katkeb nõrgema afiinsusega side KEAP1 ja NRF2-e (DLG) vahel ning enam pole KEAP1 võimeline NRF2-te degradatsioonile saatma. *De novo* sünteesitud NRF2 stabiliseerub ja liigub tuuma. Tuumas heterodimeriseerub NRF2 väikeste MAF perekonna valkudega ning indutseerib ARE sõltuvate geenide ekspressiooni. KEAP1 lokaliseerub nii normaaltingimustel kui ka stressi olukorras suures enamuses tsütoplasmas (81%) ning vähemal määral endoplasmaatilises retiikulumis (14%) ja tuumas (5%). Modifitseeritud joonis Watai *et al.* (2007) põhjal, mis kirjeldab rakus toimuvat skemaatilisel.

Tuumas dimeriseeruvad vabad NRF2 molekulid MAF (ingl *V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*) perekonna transkriptsioonifaktoritega. NRF2-MAF heterodimeer omakorda tunneb ära ja seondub NRF2-e sihtmärk geenide regulatoorses piirkonnas asuva antioksidantse vastuse elemendiga (ingl *antioxidant response element*, ARE) ning algatab paljude antioksidantsete, põletikuvastaste ja ksenobiootikumide detoksifitseerivate geenide transkriptsiooni (Itoh *et al.*, 1997; Thimmulappa *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2005). Nendeks on näiteks glutatioon S-transferaas, NAD(P)H kinooni oksüreduktaas ja glutatiooni peroksüdaas (Itoh *et al.*, 1997; Thimmulappa *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2005). KEAP1 poolisel negatiivsel regulatsioonil põhinev stressivastus on väga kiire, sest võtmerolli mängiva NRF2 valgu taseme tõus ei vaja eelnevat transkriptsiooni ja valgusünteesi tasandil sisse lülitamist. Mitmete erinevate vähkkasvajate puhul on NRF2 valk muteerunud ning sellega seoses normaalne KEAP1-NRF2 kaitserada häiritud (Taguchi &

Yamamoto, 2017). Sellisel juhul ei ole KEAP1-CUL3-E3 kompleks enam suuteline mutantset NRF2-te ära tundma (Asamura *et al.*, 2008). See aga võimaldab NRF2-e ülestimulatsiooni ning pakub arenevale vähkkasvajale kõrgeenenud kaitset kasvajat ümbritseva stressirohke mikrokeskkonna ja vähivastaste ravimite eest (Asamura *et al.*, 2008).

1.1.2. KEAP1 valgu domeenid ja reaktiivsed tsüsteiinijäägid

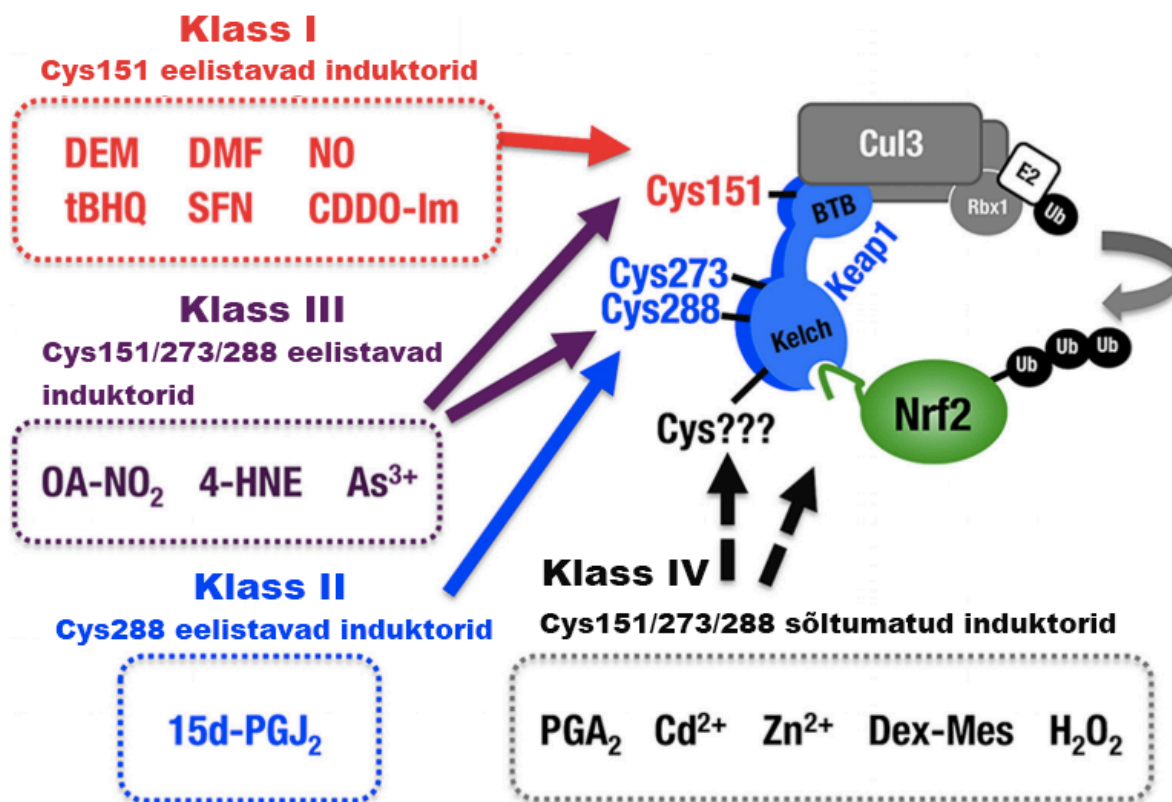
KEAP1 on multifunktsionaalne valk, mis koosneb viiest struktuursest põhidomeenist. Nendeks on NTR (ingl *N-terminal region*), BTB (ingl *Broad-Complex, Tramtrack, and Bric a`brac*), IVR (ingl *intervening region*), Kelch/DGR (ingl *double glycine repeat*) ja CTR (ingl *C-terminal region*) domeen (Itoh *et al.*, 1999; Dinkova-Kostova *et al.*, 2002) (Joonis 2.). Iga domeen täidab kindlat rolli: BTB domeeni vahendusel moodustub KEAP1 funktsionaalne dimeer ja tekib interaktsioon CUL3-E3 ubikvitiinligaasiga (Zhang *et al.*, 2004; Cullinan *et al.*, 2004; Ogura *et al.*, 2010). Kelch/DGR ja CTR domeen moodustavad seondumissaidi NRF2-le (Itoh *et al.*, 1999; McMahon *et al.*, 2004) ja ankuravad KEAP1-e tsütoskeleti külge (Itoh *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2004). Redoks-tundlik IVR domeen sisaldab konserveerunud tsüsteiinijääke ja on oluline stressivastuse kujundamisel (Ogura *et al.*, 2010). IVR domeeni tähtsaimateks tsüsteiinijääkideks peetakse aminohappeid Cys273 ja Cys288 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2015). Kolmas, võtmetähtsusega tsüsteiinijääk Cys155 asub aga hoopis BTB domeenis (Zhang & Hannink, 2000; Saito *et al.*, 2015).



Joonis 2. KEAP1-e domeenid. Oksüdatiivse stressi sensorvalk KEAP1 koosneb viiest domeenist, nendeks on N-terminaalne regioon NTR; KEAP1-e homodimeriseerumise ning CUL3-E3-ga interaktsiooni eest vastutav domeen BTB; stressitundlik domeen IVR, kus on olulised tsüsteiinijäägid Cys273 ja Cys288; NRF2-e ja tsütoskeletiga seonduv domeen Kelch/DGR ja C-terminaalne domeen CTR. Modifitseeritud joonis Saito *et al* (2015) põhjal, mis kirjeldab KEAP1-e domeene skemaatiliselt.

Erinevate stressorite mõju NRF2-e aktivatsioonile on vahendatud KEAP1-e tsüsteiinijääkide poolt väga erineva mustri alusel ning on kokkuvõtvalt jagatud nelja klassi (Joonis 3). Vastavalt klassile vajab iga mõjur ühte või mitut tsüsteiinijääki, mille kaudu vahendada KEAP1-e konformatsioonilist inaktivatsiooni ja sellega lubada NRF2-e stabiliseerumist (Saito *et al.*, 2015). Konkreetsete tsüsteiinijääkide muteerumisel kaob ka KEAP1-e võime mõjureid ära tunda ning sellega seoses stressivastust esile kutsuda (Kobayashi *et al.*, 2006; Saito *et al.*,

2015). I klassi liikmed on Cys151-te eelistavad ained, II klassi kuuluvad Cys288-t eelistavad ained (Saito *et al.*, 2015). III klassi kuuluvad stressorid, mis vajavad kõigi kolme tsüsteiinijäägi (Cys151, Cys288 ja Cys273) olemasolu (Saito *et al.*, 2015). IV klassi liikmed on aga kõigi kolme suhtes sõltumatud, st. selle klassi induktorid kutsuvad esile NRF2-e aktivatsiooni ka siis, kui kõik kolm põhilist tsüsteiinijääki on muteerunud (Saito *et al.*, 2015).



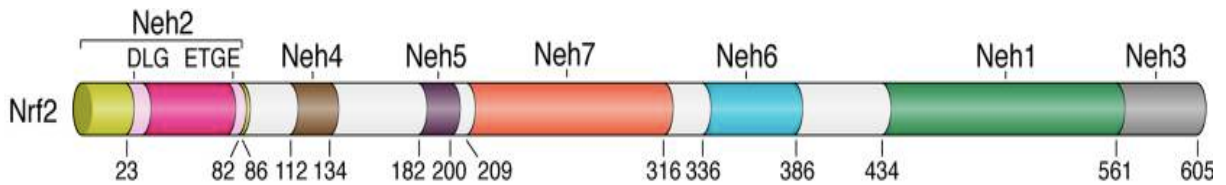
Joonis 3. KEAP1-e induktorid jagatuna nelja klassi. Vastavalt klassile modifitseerib iga induktor ühte või mitut KEAP1-e koosseisus (BTB ja/või Kelch/DGR domeenis) olevat tsüsteiinijääki, et vahendada KEAP1-e konformatsioonilist inaktivatsiooni ja NRF2-e stabiliseerumist. I klassi liikmed on Cys151-te eelistavad ained, näiteks tBHQ ja DEM. II klassi liikmed on Cys288-t eelistavad ained, III klassi liikmed on aga kõiki kolme põhilist tsüsteiinijääki (Cys151, Cys288 ja Cys273) eelistavad ained. IV klassi kuuluvad aga ained, mis on kõigi kolme põhilise tsüsteiinijäägi (Cys151, Cys288 ja Cys273) suhtes sõltumatud, näiteks H₂O₂. Modifitseeritud joonis Saito *et al* (2015) põhjal.

Vastavalt stressorite keemilisele olemusele modifitseerivad NRF2-e aktivaatorid KEAP1-e tsüsteiinijääke kas oksüdeerides, alküleerides või tekitades monomeeride siseseid ja vahelisi disulfiidsidemeid (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Fourquet *et al.*, 2010). Kahjuks ei ole veel suudetud täpselt paika panna, mis määrab, millisesse klassi iga NRF2-te aktiveeriv element kuulub, kuna on täheldatud, et sama perekonna valke nagu näiteks prostaglandiin 15d-PGJ₂ ja PGA₂-te tunnevad ära erinevad KEAP1-e tsüsteiinijäägid (Saito *et al.*, 2015). Tõestust on leidnud teooria, et oluline pole ainult NRF2-e aktivaatori struktuur, vaid kombinatsioon induktormolekuli suurusel, kujust ja elektrofiilsusel, et määrata millist KEAP1-e

tsüsteiniijääki või -jääke aktivaator modifitseerib (Saito *et al.*, 2015). Välja on pakutud niinimetatud tsüsteini koodi hüpotees, mille kohaselt kutsub iga elektrofiil esile kindla mustri põhise tsüsteiniijäägi või -jääkide modifikatsiooni ja “ründab” vaid väga täpseid saite KEAP1-e struktuuris (Wakabayashi *et al.*, 2008). Teadusmaailm pole konsensusele jõudnud ka selles, kuidas erinevad KEAP1-e tiolgruppide modifikatsioonid inhibeerivad KEAP1-CUL3-E3 kompleksi võimet NRF2-te ubikvitineerida. On postuleeritud, et näiteks Cys273 ja Cys288 modifikatsioonid muudavad antud tsüsteiniijääkide hüdrofiilsust ja sellega KEAP1-e spetsiifilist konformatsiooni nii, et KEAP1-CUL3-E3 kompleksi ubikvitiinligaasne aktiivsus kaob (Saito *et al.*, 2015). Cys151-e puhul on leitud, et induktormolekulidega reageerimine lisab sellele aminohappele suurust ja muudab KEAP1 ja CUL3-e vahelise interaktsiooni steeriliselt ebasobivaks, mis omakorda blokeerib KEAP1 sõltuva ubikvitineerimise aktiivsuse (Eggler *et al.*, 2009).

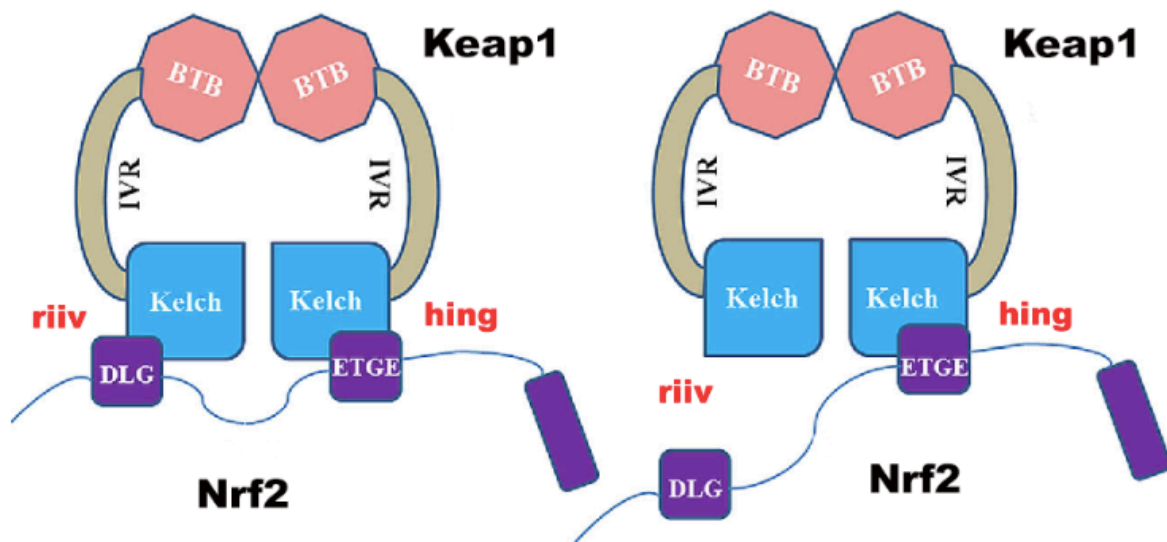
1.1.3. NRF2 valgu domeenid ja stabiliseerumine

NRF2 valk kuulub leutsiin lukk (ingl *basic leucine zipper*, bZIP) transkriptsioonifaktorite perekonda ning koosneb seitsmest kõrgelt konserveerunud Neh (ingl *NRF2-ECH homology*) domeenist (Itoh *et al.*, 1999; Canning *et al.*, 2015) (Joonis 4). Neh1 sisaldab CNC–bZIP (ingl *Cap'n'Collar - basic leucine zipper*) elementi, mis vahendab NRF2-MAF heterodimeeri moodustumist (Motohashi *et al.*, 2004). Neh2 on redoks-tundlik domeen ja sisaldab endas ETGE ja DLG juuksenõelastrukture, mis on hädavajalikud KEAP1-e dimeeriga seondumiseks (McMahon *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2006). Neh2 domeeni koostises on ka lüsiinirikas keskne heeliks, mille külge lisab funktsionaalne CUL3-E3 ubikvitiinligaas ubikvitiini molekulide keti ning suunab sellega NRF2-te KEAP1 sõltuvale lagundamisele 26S proteasoomi poolt (Itoh *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Kui Neh2 domeen kontrollib NRF2-e poolestusaega homoöstaatilistes tingimustes ja redoks olekust sõltuvalt, siis redoks-sõltumatu Neh6 domeen tasakaalustab NRF2-e hulka just stressi tingimustes (McMahon *et al.*, 2004). NRF2-e alternatiivne lagundamine toimub läbi KEAP1-st sõltumatu E3 ubikvitiinligaas β -TrCP-e (ingl *β -transducin repeat-containing protein*), mille seondumiskohaks on Neh6 domeeni motiivid (McMahon *et al.*, 2004; Chowdhry *et al.*, 2013). Neh3–5 on transaktivatsiooni domeenideks, kuna on seondumiskohaks mitmete transkriptsiooni masinavärgi komponentidele (Katoh *et al.*, 2001; Nioi *et al.*, 2005). Hiljaaegu tuvastatud Neh7 domeeni kaudu võidakse represseerida NRF2 sõltuvat transkriptsiooni aktivatsiooni läbi otsese interaktsiooni RXR α (ingl *retinoic X receptor α*) valguga (Canning *et al.*, 2015).



Joonis 4. NRF2-e domeenid. Transkriptsioonifaktor NRF2 koosneb seitsmest Neh domeenist. Nendeks on MAF valkudega heterodimeriseerumise domeen Neh1; ETGE ja DLG motiivi sisaldav ja CUL3-E3 ubikvitiinligaasi sihtmärgiks olev domeen Neh2; transaktiivatsiooni eest vastutavad domeenid Neh3, Neh4 ja Neh5; KEAP1 sõltumatu NRF2-e degradatsiooni domeen Neh6, mis kontrollib NRF2-e taset stressi olukorras; NRF2-e poolset transkriptsiooni aktivatsiooni represseeriv domeen Neh7. Modifitseeritud joonis Canning *et al.* (2015) põhjal, mis kirjeldab NRF2-e domeene skemaatilisel.

Normaaltingimustes toimub homodimeerse KEAP1-e ja monomeerse NRF2-e vaheline seondumine niinimetatud “hinge ja riivi” mudeli alusel (Tong *et al.*, 2006). Esmalt seondub ühe KEAP1 molekuli Kelch/DGR domeen NRF2-e ETGE motiiviga ning seejärel teise KEAP1 molekuli Kelch/DGR domeen DLG motiiviga (Joonis 5). Esimene interaktsioon käitub “hinge” ja teine “riivina”. Mõlemad seondumiskohad on vajalikud, et “lukustada” NRF2-e Neh2 domeeni lüsiinijäägid CUL3-E3 ubikvitiinligaasi aktiivsuse jaoks õigesse orientatsiooni. (McMahon *et al.* 2006; Tong *et al.*, 2006). ETGE ja DLG motiivide elektrostaatiliselt määravad ära seondumise järjekorra KEAP1 Kelch/DGR domeeniga. Kuna ETGE motiivi ja Kelch/DGR domeeni vahel tekib suurem hulk elektrostaatilisi interaktsioone, on KEAP1-e afiinsus ETGE motiivi suhtes suurem, mistõttu toimub esmane interaktsioon just nende kahe elemendi vahel (Tong *et al.*, 2007; Padmanabhan *et al.*, 2008). Kuigi Kelch/DGR domeeni afiinsus DLG motiivi suhtes on nõrgem, on mõlemad interaktsioonid absoluutselt vajalikud NRF2-e represseerimiseks ja degradatsioonile suunamiseks (McMahon *et al.*, 2004; McMahon *et al.*, 2006). Oksüdatiivse ja elektrofiilse stressi tingimustes ei suunata ei valmis sünteesitud ega ka *de novo* sünteesitud NRF2-te enam degradatsioonile (Itoh *et al.*, 1999). Valmis sünteesitud NRF2 jääb stressi tingimustes KEAP1 dimeeriga seotuks vaid läbi ETGE motiivi ning interaktsioon KEAP1-e Kelch/DGR domeeni ja madalama elektrostaatilise potentsiaaliga DLG motiivi vahel katkeb (Tong *et al.*, 2006). Selline pooleldi seotud NRF2 blokeerib aga uute NRF2 molekulide produktiivse (kahe juuksenõela kaudu) interaktsiooni KEAP1-ga (Tong *et al.*, 2006). Kuna interaktsiooni ei teki, jääb vabaks *de novo* sünteesitud NRF2-e Neh2 domeen, mis sisaldab endas ka tuuma lokalisatsioonisignaali (NLS) (Li *et al.*, 2005; Theodore *et al.*, 2008). Kuna vabaks jäänud NRF2-e tase tõuseb piisavalt kõrgele ja ei ole läbi KEAP1-e enam tsütoplasma külge ankurdund, siis saabki NRF2 läbi NLS-i tuuma liikuda ning seal MAF perekonna valkudega heterodimeriseeruda (Theodore *et al.*, 2008).



Joonis 5. KEAP1-NRF2 interaktsiooni “hinge ja riivi” mudel. Normaalingimustes seondub homodimeerse KEAP1-e üks Kelch/DGR domeen esmalt NRF2-e ETGE motiiviga ning seejärel teine Kelch/DGR domeen DLG motiiviga. Esimene interaktsioon käitub “hinge” ja teine “riivina”. Stressi olukorras nõrgema afiinsusega DLG motiiv katkeb ning NRF2 jääb KEAP1-ga seotuks vaid läbi ETGE juuksenõela. Poolikult seotud NRF2 ei ole enam õiges orientatsioonis ubikvitineerimise tarbeks, mistõttu jääb NRF2 KEAP1-ga seotuks ning blokeerib sellega *de novo* sünteesitud NRF2 valkude võimalust KEAP1-ga interakteeruda. *De novo* sünteesitud NRF2 valgud stabiliseeruvad, liiguvad tuuma ning aktiveerivad seal ARE-sõltuvate detoksifitseerivate geenide ekspressiooni. Modifitseeritud joonis Deshmukh *et al* (2017) põhjal, mis kirjeldab rakus toimuvat lihtsustatud kujul.

Tuuma ekspordi signaal (NES) asub aga Neh1 domeenis, mis vahendab NRF2-MAF kompleks tekkimist (Motohashi *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005). Seega kui NLS signaal pääseb stressi tingimustes vabaks, siis NES signaal maskeerub MAF valkudega ning aktiivne NRF2 akumulereerub tuumas (Li *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2006; Theodore *et al.*, 2008). Lisaks võib NRF2-e tase tõusta ka nende NRF2 molekulide arvelt, mis KEAP1-ga vaid pooleldi seotuks jäid. Nimelt konkureerib sellises olukorras NRF2 ka teiste valkudega, millele on vaid üks ETGE motiiv, KEAP1-ga seondumisele (Hast *et al.*, 2013; Tamir *et al.*, 2017). Nendeks võib olla näiteks metallopeptidaas DPP3 (ingl *dipeptidyl peptidase 3*), DNA helikaasi kompleksi liige MCM3 (ingl *Minichromosome Maintenance Complex Component 3*), tsütoskeleti dünaamikat mõjutav WDR1 (ingl *WD Repeat-Containing Protein 1*) või kasvajakasvavastane valk PALB2 (ingl *partner and localizer of BRCA2*) ja paljud teised (Hast *et al.*, 2013). Kuigi mõlema juuksenõelaga interaktsioon on kõrgema afiinsusega ning tavatingimustes rohkem eelistatud, võib stressi olukorras konkurentsete valkude kõrge tase ka vaid üht juuksenõela pidi KEAP1-e küljes olevaid NRF2 molekule välja tõrjuda (Hast *et al.*, 2013). Ka sedamoodi välja tõrjutud NRF2 molekulid saavad tuuma liikuda ning panustada kiiremasse NRF2-e vastusesse (Hast *et al.*, 2013).

1.2. DNA kahjustuste vastane kaitse

DNA struktuursed kahjustused, mis tekivad reaktsioonides ROS-ide või genotoksiliste ainetega põhjustavad replikatsiooni ja transkriptsiooni häireid ning mängivad olulist rolli vanusega seotud haiguste ja vähkkasvajate tekkes. Kahjustuste parandamiseks, replikatsiooni vigade vältimiseks ja genoomi terviklikkuse tagamiseks on välja kujunenud keerukas rakuliste radade võrgustik (ingl *DNA damage response*, DDR), mis sisaldab endas mitmeid DNA parandus- ja rakutsükli kontrollpunkt mehhanisme (Ciccia & Stephen, 2010). DDR võrgustiku ühed olulisemad signaali vahendajad kahjustusi äratundvate ja nende likvideerimise eest vastutavate valkude ja valk-komplekside vahel on ATM-CHK2 ja ATR-CHK1 kontrollkinaaside rajad (Smith *et al.*, 2010). ATM (ingl *ataxia telangiectasia mutated*) ja ATR (ingl *ATM-Rad3-related*) kinaase aktiveerivad spetsiifilised sensorvalgud, mis tunnevad ära DNA kahjustusi ning käivitavad vastava vastussignaali kaskaadi (Falck *et al.*, 2005). ATR kinaasi põhiliseks aktiveerivaks signaaliks on RPA (ingl *replication protein A*) valguga kaetud üheaheelaline DNA (Zou & Elledge, 2003), mis tekib näiteks replikatsioonikahvli takerdumisel (Byun *et al.*, 2005) või kahjustatud DNA nukleolüütilisel töötlemisel (Raderschall *et al.*, 2002). ATM kinaasi peamiseks aktiveerivaks signaaliks on aga DNA kaheaheelalised katked (ingl *DNA double strand breaks*, DSB) (Ahn *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2000; Shiloh, 2003). Lisaks sellele on ATM kinaasil võime aktiveeruda ka raku redoks tasakaalust sõltuvalt. Sellisel juhul toimub aktivatsioon otse läbi ROS-ide ning ei vaja DSB olemasolu ega sensorvalkude vahendust (Marcucci *et al.*, 2010). Selliseid otse ROS-idele reageerivaid sensorsüsteeme on rakus mitmeid, nagu näiteks eespool käsitletud KEAP1-NRF2 rada. Enamasti toimetatakse redoks signaal edasi tsüsteiinijääkide modifikatsiooni kaudu. Seda ka ATM kinaasi puhul, kus tsüsteiinijääkide oksüdatsioon muudab inaktiivse mitte-kovalentse ATM dimeeri mitmete disulfiidsidemetega seotud aktiivseks kovalentseks dimeeriks (Marcucci *et al.*, 2010). Kui aktivatsioon toimub aga DNA kahjustusest sõltuvalt, siis inaktiivne dimeerne ATM autofosforüleerub ja konverteerub aktiivseteks monomeerideks (Bakkenist & Kastan, 2003). Aktiveerunud ATM ja ATR kinaasil on terve hulk erinevaid allavoolu asetsevaid sihtmärk valke, nendest ühed kõige olulisemad on CHK2 (ingl *checkpoint kinase 2*) ja CHK1 (ingl *checkpoint kinase 1*) kontrollpunkt kinaasid. ATM kinaasi peamiseks allavoolu sihtmärgiks on CHK2 (Ahn *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2000; Hirao *et al.*, 2002) ja ATR kinaasi põhiliseks sihtmärgiks CHK1 (Guo *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000). ATM kinaas fosforüülib CHK2-e Ser-Gln/Thr-Gln (SQ/TQ) domeeni, mis sisaldab endas seitset SQ/TQ motiivi (Ser19, Thr26, Ser28, Ser33, Ser35, Ser50, Thr68), millest Thr68 on üks tähtsamaid aktiveeriva fosforüleerimise saite (Kim

et al., 1999; Matsuoka *et al.*, 2000). Kõik neli kinaasi kannavad “hädahoju” signaali edasi oma substraatide fosforüleerimise kaudu. Selle tulemusel võib muutuda märklaudvalkude konformatsioon, rakuline lokalisatsioon või interaktsioon teiste valkudega, mis omakorda käivitavad kahjustustele adekvaatseks reageerimiseks vajalikud biokeemilised reaktsioonid rakus (Matsuoka *et al.*, 2007; Shiloh & Ziv, 2013; Blackford & Jackson, 2017). Väiksema genotoksilise stressi korral peatatakse rakutsükkel ning kahjud likvideeritakse erinevate reparatsiooni radade koordineerimise kaudu (Ciccia & Elledge, 2010; Blackford & Jackson, 2017). Pöördumatute kahjustuste korral aga aktiveeritakse proliferatsiooni peatumine või apoptoos (Ciccia & Elledge, 2010; Blackford & Jackson, 2017). Nii CHK2 kui ka CHK1 kinaasil on terve hulk substraate, mille fosforüleerimine mõjutab erinevaid reguloorseid aspekte rakus, näiteks inhibeerivad nad rakutsükli kriitilist tähtsust mängivate tsükliin sõltuvate proteiinkinaaside (ingl *cyclin-dependent protein kinase*, CDK) aktiivsust (Liu *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000). CDK-de inhibeerimine omakorda takistab replikatsiooni läbiviimist ja aeglustab rakutsükli kulgu ning annab rakule lisaaega võimalike kahjustuste parandamiseks ja vajaduse korral apoptoosi esile kutsumiseks (Liu *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000).

1.3. Eksogeense vesinikperoksiidi kasutamine oksüdatiivse stressi indutseerimiseks

Teadusmaailm on KEAP1-NRF2 reguloorse raja aktiveerimise tarbeks kasutanud mitmeid erinevaid keemilisi indutseerijad, mis kutsuvad esile oksüdatiivset stressi rakus. Kõige enam on kasutatud leidnud ksenobiootilised ained, väga sageli näiteks toiduainetööstuses kasutatavad säilitusained (Sheftel, 2000) *tert*-butüülhüdrokinoon (tBHQ) ja dietüülmaleaat (DEM) (Watai *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Takaya *et al.*, 2012; Iso *et al.*, 2016). Mõlemad ühendid kuuluvad I klassi KEAP1 induktorite hulka (Saito *et al.*, 2015), mis alküleerivad KEAP1-e BTB domeenis olevat Cys151-te muutes sellega KEAP1-e konformatsiooni ning lubades NRF2-l stabiliseeruda (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Fourquet *et al.*, 2010). Antud ühendid ei esine kehas loomulikult ning on rakule võõrad, mistõttu ei mimikeeri nad rangelt võttes ka endogeenset rakusisest stressi.

Üheks enim kasutatud rakusisese oksüdatiivse stressi mimikeerijaks on vesinikperoksiid, kuna see molekul esineb rakusiseselt ka normaalsetes tingimustes, on üsna stabiilne ning difundeerub hästi läbi rakumembraanide (Chance *et al.*, 1979). Vesinikperoksiidi on KEAP1-NRF2 raja aktiveerimiseks kasutatud aga üsna vähesel määral ning infot optimaalsete tingimuste ja sobivate rakuliinide kohta napib. Mõned tööd on väidetavalt saavutanud selge NRF2-e aktivatsiooni kõrgemate H₂O₂ kontsentratsioonide ja pikemate

inkubatsiooniaegadega (Saito *et al.*, 2015), samas, kui teised tööd on viidanud, et just madalamad kontsentratsioonid ja lühemad mõjuajad võiksid olla optimaalsed (Fourquet *et al.*, 2010). H₂O₂ modifitseerib KEAP1-e tsüsteiinijääke oksüdeerimise kaudu tekitades KEAP1-e monomeeride sisseid ja vahelisi disulfiidsildu (Fourquet *et al.*, 2010). Erinevalt tBHQ ja DEM-st kuulub H₂O₂ IV klassi induktorite hulka, mis on kolme põhilise tsüsteiinijäägi (Cys151, Cys273, Cys288) suhtes sõltumatud (Saito *et al.*, 2015). Siiani polegi täpselt teada, milliseid tsüsteiinijääke antud klassi liikmed NRF2-e aktiveerimiseks vajavad.

Kuigi vesinikperoksiidi peetakse nõ "loomulikuks" oksüdatiivse stressi indutseerijaks, on siiski täheldatud, et endogeenselt tekkinud ja eksperimentaalsetes tingimustes lisatud eksogeenne H₂O₂ omab rakkudes mõnevõrra erinevat efekti (Wiese *et al.*, 1995; Davies, 1999; Gülден *et al.*, 2010). Rakusiseselt tekkinud H₂O₂, mis ületab oma kontsentratsiooniga 1 µM-i läve kutsub esile oksüdatiivset stressi, kasvu pidurdust ja raku surma (Antunes & Cadenas, 2001), samal ajal, kui eksogeenselt lisatud H₂O₂, mis jääb 3-15 µM-i vahemikku vastupidiselt stimuleerib rakkude jagunemist ja kasvu (Wiese *et al.*, 1995; Davies, 1999). On paika pandud, et prolifereeruvad imetajarakud järgivad kindlat, kontsentratsioonist sõltuvat, mustrit oma vastuses H₂O₂-e inkubatsioonile *in vitro*. Väga madalad H₂O₂-e tasemed (<15 µM) soodustavad rakujagunemist, veidi kõrgemad kontsentratsioonid (120–150 µM) kutsuvad esile lühiajalise kasvu pidurdumise, keskmised H₂O₂-e tasemed (250–400 µM) viivad rakud aga pöördumatu kasvu aresti ning väga kõrged kontsentratsioonid, mis ületavad 1000 µM-i piiri põhjustavad juba apoptoosi või nekrootilist raku surma (Wiese *et al.*, 1995; Davies, 1999; Gülден *et al.*, 2010).

Lisaks H₂O₂-e kontsentratsioonile on eksperimentaalsetes oludes tulemuste interpreteerimisel oluline jälgida ka inkubatsiooniaega (Gülден *et al.*, 2010). On teada, et normaalsetes tingimustes hoitakse endogeenselt tekkinud H₂O₂-e nivoo antioksidantide kaudu pidevalt madalal tasemel. Samas on näidatud, et ka eksogeenselt lisatud H₂O₂-e neutraliseerimisega saavad rakud hästi hakkama (Gülден *et al.*, 2010). *In vitro* süsteemis lisatud H₂O₂-e lagundamine algab koheselt pärast inkubatsiooniaja algust (Gülден *et al.*, 2010). Vesinikperoksiidi neutraliseerimise kiirus ja efektiivsus sõltub nii lisatavast H₂O₂-e kontsentratsioonist kui ka rakkude tihedusest (Gülден *et al.*, 2010). Väikeste kontsentratsioonide korral neutraliseerivad rakud H₂O₂-e peaaegu täielikult üsna kiiresti, näiteks Gülден *et al.* näitavad, et 50 µM H₂O₂ on 20 minuti pärast peaaegu täiesti ära neutraliseeritud. Kõrgematel kontsentratsioonidel jääb aga H₂O₂-e eemaldamine teatud tasemele pidama ja rakud ei ole võimelised sellest enam taastuma (Gülден *et al.*, 2010). H₂O₂-e eemaldamise kiirus on lineaarses sõltuvuses raku tihedusest, mida tihedamad on

rakud, seda kiiremini toimub neutraliseerimine, seega on raku tihedus samuti oluline vesinikperoksiidi tsütotoksilisuse indikaator (Gülden *et al.*, 2010; Fourquet *et al.*, 2010). Vesinikperoksiidi oksüdatiivse stressi indutseerijana kasutades peaks arvesse võtma kõiki eespool välja toodud asjaolusid, et vältida liigselt kõikuvaid ja ebausaldusväärseid tulemusi, mida paljudes teadusartiklites kohata võib. Ka ksenobiootikumide kasutusel peab arvestama samu asjaolusid. tBHQ efekt rakule on kontsentratsioonist ja inkubatsiooniajast sõltuvalt kas kaitsev aktiveerides NRF2-e poolt reguleeritavaid gene või tsütotoksiline põhjustades oksüdatiivset stressi ja kahjustades makromolekule (Wang *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2011; Eskandani *et al.*, 2014).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö Eesmärgid

Antud magistritöö on osa suuremast projektist, kus uuritakse DNA replikatsiooni regulatsiooni oksüdatiivse stressi tingimustes. Projekti täpsem siht on leida seoseid KEAP1-NRF2 signaalraja ning replikatiivse helikaasi subühiku MCM3-e vahel, mis samuti KEAP1-ga interakteerub. Käesolev töö keskendus KEAP1-e peamise interaktsioonipartneri, NRF2-e aktivatsiooni uurimisele. Töö eesmärk oli paika panna tingimused, kuidas edasisi NRF2-e aktiveerimise katseid läbi viia. Selle tarbeks testiti erinevaid rakuliine, oksüdatiivse stressi indutseerijaid (keskendudes H₂O₂-le), ajapunkte ja kontsentratsioone.

Uurimisküsimused:

1. Milline on H₂O₂-e efekt NRF2-e indutseerijana võrreldes teiste laialt kasutamist leidvate ksenobiootiliste aktivaatoritega?
2. Kas KEAP1-NRF2 ja CHK1/CHK2 stressivastusrajad on teineteisest sõltuvad?
3. Kas on erinevusi eri rakuliinide stressivastuses?

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Töös kasutatud rakuliinide kasvatamine koekultuuris

Töös kasutati kolme rakuliini – inimese nahast eraldatud spontaanselt immortaliseerunud aneuploidsete keratinotsüütide püsirakuliini HaCat (ingl *human adult, low calcium, high temperature*, ATCC, Ameerika Ühendriigid), inimese eesnahast eraldatud primaarsete keratinotsüütide rakuliini HPEK (ingl *human primary epidermal keratinocytes*, CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Šveits) ning inimese embrüonaalsetest neerurakkudest eraldatud rakuliini HEK293 (ingl *human embryonic kidney 293*, ATCC). Rakke kasvatati 100 mm läbimõõduga koekultuuri tassidel 10 ml-s söötmes, 5% CO₂-e sisaldusega inkubaatoris temperatuuril 37°C. HaCat ja HEK293 rakke kasvatati 10% veise loote seerumit sisaldavas DMEM söötmes (ingl *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Thermo Fisher, Ameerika Ühendriigid) ning passeeriti iga 2–3 päeva tagant, tootja protokoll järgides. HPEK rakke kasvatati Cnt-Prime söötmes (CELLnTEC) ning passeeriti iga 5 päeva tagant tootja protokoll järgides, passaažide arv jäi alla 10-ne vältimaks rakkude diferentseerumist. Rakkude eemaldamiseks koekultuuri tassi pinnalt kasutati HaCat ja HEK293 rakkude puhul trüpsiin-EDTA (Pan Biotech, Saksamaa) ning HPEK rakkude puhul accutase lahust

(CELLnTEC). HPEK rakuliini puhul kanti igale uuele 100 mm koekultuuri tassile ligikaudu 250 000 rakku. Rakke loendati Countess masinas (Thermo Fisher Scientific), kasutades trüpaansinist (Thermo Fisher Scientific) surnud rakkude eristamiseks elusatest. Enne katsete läbiviimist passeeriti rakud 6-auguga koekultuuri plaatidele 2 ml söötmesse. HaCat ja HEK293 rakkudel lasti kasvada 1–2 ööpäeva 50–60% konfluentsuse saavutamiseks ning HPEK rakkudel 2–4 ööpäeva 30% konfluentsuse saavutamiseks.

2.2.2. Oksüdatiivset stressi ja proteasoomi inhibitsiooni indutseerivad ühendid

Oksüdatiivse stressi indutseerimiseks inkubeeriti rakke nelja erineva stressoriga. Kasutusel oli vesinikperoksiid (H_2O_2 ; Sigma-Aldrich, Ameerika Ühendriigid), *tert*-butüülhüdrokinoon (tBHQ; Sigma Aldrich), 3-amino-1,2,4-triasool (3-AT; Sigma-Aldrich) ning dietüülmaelaat (DEM; Santa Cruz Biotechnology Inc., Ameerika Ühendriigid). Proteasoomi inhibeerimiseks kasutati MG132 (ingl *carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal*) proteasoomi inhibiitorit (Calbiochem, Ameerika Ühendriigid).

Vesinikperoksiidist valmistati vahetult enne rakkudele lisamist 10 mM-ne vahelahus soojas 1x PBS lahuses (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4) ning seejärel lahjendati vastavalt eksperimendi eesmärgile kas 50 μM , 120 μM , 300 μM , 600 μM või 1000 μM -se lõppkontsentratsioonini koekultuuri plaadil. tBHQ-st tehti esmalt 200 mM-ne vahelahus dimetüülsulfoksiidis (DMSO; Panreac AppliChem, Saksamaa). Söötmesse lisati vahelahust nii, et saavutada lõppkontsentratsioon 50 μM . 3-AT ja DEM-st tehti esmalt vastavalt 595 mM ja 62 mM-ne vahelahus, 3-AT puhul deioniseeritud vees ning DEM-i puhul soojas söötmes. Söötmesse lisati vahelahuseid nii, et saavutada lõppkontsentratsioon 20 mM 3-AT jaoks ja 100 μM DEM-i jaoks. Proteasoomi inhibiitorist MG132-st tehti vahetult enne rakkudele lisamist 4,2 mM-ne vahelahus soojas söötmes ning lisati rakkudele 20 μM -se lõppkontsentratsiooniga. Katsele eelneval päeval vahetati vana sööde uue vastu vähendamaks söötme vahetusega kaasnevat lisastressi katse päeval. Rakke inkubeeriti H_2O_2 , tBHQ, DEM, 3-AT või MG132-ga olenevalt katsest kas 20 minutit, 2 tundi, 5 tundi või 6 tundi.

2.2.3. Rakkude kogumine, lüüsimine ja fraktsioneerimine

Nägemaks, kas ja kuidas mõjutavad erinevad oksüdatiivset stressi indutseerivad ühendid uurimise all olevate valkude taset rakus, oli vaja rakud vahetult pärast inkubatsiooniaja lõppu koguda ja lüüsida. Selle tarbeks asetati 6-auguga plaadid koos rakkudega jääle, aspireeriti rakkudelt sööde ning pesti jääkülma 1x PBS lahusega. Rakkude lüüsimiseks lisati igasse auku 150 μl 2x SDS Laemmli puhvrit (60% glütserool, 300 mM TrisHCl pH 6,8, 864

mM β -merkcaptoetanol, 12% SDS, 01% broomfenoolsinine, 12 mM EDTA pH 8,0), hõõruti viskoosne rakulüsaat plaadi küljest lahti ja pipeteeriti ettevaatlikult eppendorfi tuubi. Proovide disperseerimiseks ning valkude denatureerimiseks keedeti proovid 100°C juures 10 minutit ning sonikeeriti ultraheliga 4°C juures 5 minutit. Saadud proove analüüsiti *Western blot* meetodil.

Analüüsimaks, kuidas mõjutavad erinevad stressorid ja proteasoomi inhibiitor valkude lokaliseerimise rakus, kasutati lisaks ka fraktsioneerimise protokoll, mis eraldab rakulüsaadi tsütoplasma (*cytoplasmic extract*, CPE), membraani (*membrane extract*, ME), lahustuva tuuma (*soluble nuclear extract*, SNE), kromatiiniga seotud tuuma (*chromatin bound nuclear extract*, ChBNe) ning tsütoskeleti (*cytoskeleton*, CySk) fraktsiooniks (Thermo Fisher, *Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells*). Fraktsioneerimise protokoll esimese samm nägi ette samuti inkubatsiooni järgset rakkude kogumist. Esmalt aspireeriti rakkudelt sööde ning pesti toatemperatuuril oleva 1x PBS lahusega, seejärel leotati rakud lahti toasooja trüpsiin-EDTA lahusega. Trüpsiin inhibeeriti seerumit sisaldava DMEM söötmega. Lahtisuspendeeritud rakud koguti eppendorfi tuubidesse ning tsentrifugeeriti (Eppendorf Centrifuge 5415R, edasised tsentrifugeerimised sama masinaga) 500 g ja 4°C juures põhja. Supernatant eemaldati ning rakud suspendeeriti jääkülma 1x PBS-iga. Nii totaalne fraktsioon kui ka rakkude suspensioon, millega teostati edasiseid fraktsioneerimise etappe tsentrifugeeriti 500 g ja 4°C juures 2–3 minutit. Edasised etapid vajasis lisareagentide kasutust, nendeks olid CEB (ingl *Cytoplasmic Extraction Buffer*) puhver, mis eraldab tsütoplasmaatilise ekstrakti, MEB (ingl *Membrane Extraction Buffer*) puhver, mis eraldab membraanse ekstrakti, NEB (ingl *Nuclear Extraction Buffer*) puhver, mis eraldab tuuma lahustuva ekstrakti. Kromatiiniga seotud tuuma ekstrakti eraldamiseks lisati NEB puhvrile CaCl_2 ja mikrokoki nukleas. Tsütoskeleti fraktsiooni tarbeks kasutati PEB (ingl *Pellet Extraction Buffer*) puhvrit. Igale etapile vastav reagent lisati ettenähtud ruumalas koos proteasoomi inhibiitoritega vahekorras 1:100-le, ning proov suspendeeriti või segati *vortex* masinal (Scientific Industries Vortex-Genie 2, Ameerika Ühendriigid, edaspidi sama), inkubeeriti olenevalt protokollist kas jääs või toatemperatuuril, tsentrifugeeriti rakud põhja ning kanti supernatant (uus fraktsioon) jää peal olevasse puhtasse tuubi. Igale eraldatud fraktsioonile lisati $\frac{1}{3}$ proovi ruumalast 6x SDS Laemmli puhvrit. Viimase etapina denatureeriti valgud ja homogeniseeriti proov, selle tarbeks keedeti proovid 100°C juures 5–10 minutit ning segati *vortex* masinal. Saadud proove kasutati *Western blot* analüüsis.

2.2.4. *Western blot* analüüs

Western blot meetodit kasutati fraktsioneeritud proovides olevate valkude detekteerimiseks. Esimese sammuna lahutati valgud geelelektroforees meetodil SDS-poliüakrüülamiid geelis (Green & Sambrook, 2012) 1x SDS jooksupuhvris (0,125M Tris, 0,9M glütsiin, 0,5% SDS) 180 voldi (V) juures. NRF2, CHK1 ja CHK2 valkude uurimiseks jooksutati proovid 10% geelis. Totaalse rakulüsaadi proove kanti geelile 6 µl ning teiste fraktsioonide proove 8 µl. Hindamaks valkude molekulmassi laeti geelile ka 5 µl Pageruler Prestained suurusmarkerit (Thermo Fisher Scientific). Elektroforeesile järgnes valkude ülekanne geelilt eelnevalt metanooliga aktiveeritud PVDF (polüvinülideendifluoriid) membraanile. Ülekanne toimus Bio-Rad'i TransBlot SD ülekandemasinas (Bio-Rad, Ameerika Ühendriigid) poolkuivas ülekandepuhvris (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% etanool) 12 V juures 1 tunni jooksul. Enne antikehadega töötlust blokeeriti membraan 5% lõssilahuses [lõssipulber, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20] toatemperatuuril 30–40 minutit. Blokeerimisele järgnes primaarse antikeha töötlus 2% või 5% veise seerumalbumiini lahuses (BSA, ingl *Bovine Serum Albumin*) [2% või 5% BSA pulber, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20]. Membraani inkubeeriti antikeha lahuses 1 ööpäev 4°C juures loksutil. Enne sekundaarse antikeha töötlust pesti membraanid TBS-Tween 20 pesulahuses [50 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20] 3 korda 10 minutit. Seejärel töödeldi membraani sekundaarse antikehaga 2% lõssilahuses 1 tunni jooksul toatemperatuuril loksutil. Pärast sekundaarse antikeha töötlust pesti membraan taaskord 3 korda 10 minutit TBS-Tween 20 pesulahuses. Signaali detekteerimiseks töödeldi membraan vastavalt vajadusele kas ECL (Amersham, GE Healthcare, Suurbritannia) või Femto Super Signal (Thermo Fisher Scientific) ilmutusreagentidega ning eksponeeriti röntgenfilmile (AGFA Healthcare, Belgia). Filmid skaneeriti arvutisse ning töödeldi Adobe Photoshop ja Adobe Illustrator programmiga (Adobe Systems, Ameerika Ühendriigid). Üldise valgu taseme võrdlemiseks eri proovide vahel töödeldi valkudega kaetud membraani kolloidse kullavärviga. Esimese etapina inkubeeriti membraan deioniseeritud vees lahjendatud 10% NP40 lahusega (Sigma-Aldrich) 30 minuti jooksul toatemperatuuril loksutil. Seejärel pesti membraani 5 korda destilleeritud vees ning viimaks inkubeeriti *Colloid Gold Total Protein Stain* kullavärviga (Bio-Rad) üleöö toatemperatuuril. Töödeldud membraan loputati destilleeritud vees, kuivatati, skaneeriti arvutisse ning töödeldi Adobe tarvara abil.

Tab 1. Western blot analüüsis kasutatud antikehad, nende lahjendused ja tootjad

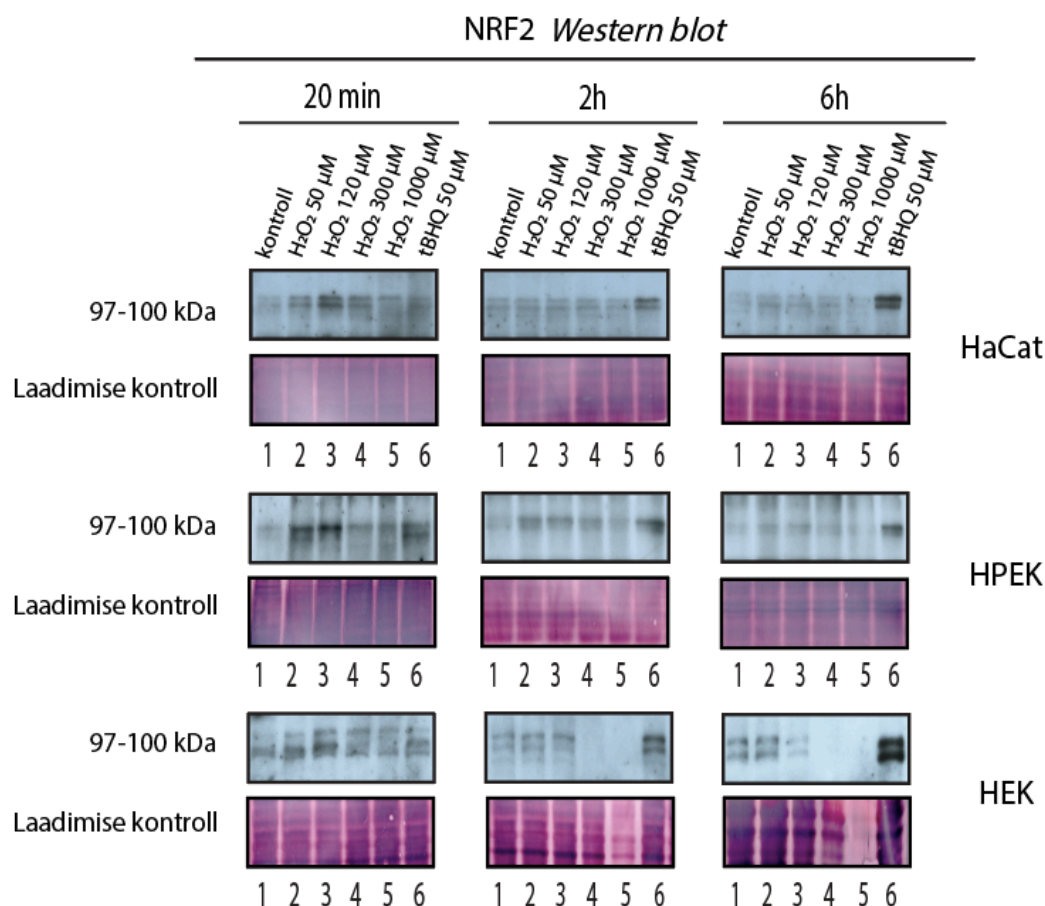
| Primaarne antikeha | | Tootja | Lahjendus | Sekundaarne antikeha | Tootja | Lahjendus |
|---------------------------------|----------------------------|---|-----------|-------------------------------------|--------|-----------|
| anti-NRF2 (D1Z9C) | küüliku monoklonaalne IgG | Cell Signaling Technology, Ameerika Ühendriigid | 1:1000 | Kitses toodetud küüliku IgG vastane | LabAS | 1: 10 000 |
| anti-fosfo-CHK2(Ser19) (#2666) | küüliku polükloonaalne IgG | Cell Signaling Technology | 1:1000 | Kitses toodetud küüliku IgG vastane | LabAS | 1:10 000 |
| anti-fosfo-CHK1(Ser317) (#2344) | küüliku polükloonaalne IgG | Cell Signaling Technology | 1:1000 | Kitses toodetud küüliku IgG vastane | LabAS | 1:10 000 |

2.3. Tulemused

2.3.1. Eksogeense vesinikperoksiidi efekt NRF2-e aktiveerimisele on kiire ja pöörduv

Vesinikperoksiid sai esialgu valitud KEAP1-NRF2 raja aktivaatoriks lähtuvalt kirjanduse andmetest, mille põhjal on see aine “klassikaline” ja “loomulikku” oksüdatiivset stressi mimikeeriv stressivastuse induktor. Uurimaks, kas ja millistes tingimustes on H₂O₂ võimeline aktiveerima NRF2-te, inkubeeriti HaCat, HEK293 ja HPEK rakke viie erineva H₂O₂-e kontsentratsiooniga (50 µM, 120 µM, 300 µM, 600 µM ja 1000 µM) kolmel erineval mõjuajal (20 minutit, 2 tundi ja 6 tundi). H₂O₂-e kontsentratsioonide valimisel võeti arvesse asjaolu, et madalamad kontsentratsioonid kutsuvad teadaolevalt esile ajutist kasvu peatumist, keskmised tasemed püsivad kasvu peatumist ja kõrged kontsentratsioonid juba raku surma (Wiese *et al.*, 1995; Gulden *et al.*, 2010). Kuna rakkudele lisatava H₂O₂-e efekt on sõltuvuses ka raku tihedusest (Gulden *et al.*, 2010; Fourquet *et al.*, 2010), siis kasutati igas katses sarnase tihedusega rakukultuure. HaCat ja HEK293 rakuliini puhul lasti rakkudel kasvada 50–60% konfluentsuseni. HPEK rakkude puhul kasutati aga 30% tihedusega tasse, kuna antud primaarne rakuliin kipub kõrgemal tihedusel diferentseeruma.

NRF2 valgu aktiveerumist ja stabiliseerumist visualiseerib *Western blot* analüüs, kus võrreldi NRF2 valgu tasemeid töötlemata kontrollrakkudes ja H₂O₂-ga töödeldud rakkudes. Antud katseskeemis kinnitab NRF2-e aktivatsiooni NRF2-e taseme tõus 50 µM ja 120 µM H₂O₂-e juures 20 minuti ajapunktis (Joonis 6; 20 min; rada 2 ja 3 vs rada 1) kõigis kolmes rakuliinis. Kõrgemad H₂O₂-e kontsentratsioonid NRF2 stabiliseerumist esile ei kutsu.



Joonis 6. H₂O₂-e aja ja kontsentratsiooni tiitrimine – NRF2-e aktivatsioon H₂O₂-ga on kiire ja lühiajaline. Joonisel on näha totaalvalgu *Western blot* analüüs NRF2 vastase anti kehaga (kaksikbänd 97–100 kDa). Üldise valgu taseme hindamiseks on lisatud ka kolloid kullaga värvitud membraanid (laadimise kontroll). Analüüsiks kasutati HaCat, HPEK ja HEK293 rakuliini rakke, mida inkubeeriti nelja erineva H₂O₂-e kontsentratsiooni (50 µM, 120 µM, 300 µM ja 1000 µM) või 50 µM tBHQ-ga 20 minuti, 2 tunni või 6 tunni vältel. Tulemused kordusid kahes eraldiseisvas katses kõigi kolme rakuliini puhul.

Selline taseme tõus on aga nõrk ja lühiajaline. Pikemates ajapunktides langeb NRF2-e hulk tagasi baastasemele olles taas võrdne kontrollrakkudes oleva valgu hulgaga (Joonis 6; 2 h ja 6 h; rada 2 ja 3 vs rada 1). Huvitaval kombel tunduvad HEK293 rakuliini rakud olema tundlikumad H₂O₂-e poolt tekitatavale stressile võrreldes HaCat ja HPEK rakkudega. Nimelt oli nende rakkude puhul visuaalselt näha alates 2 tunnist ja 300 µM-st H₂O₂-e kontsentratsioonist rakkude suuremist, mida kinnitab ka *Western blot* analüüs ja valgu

totaalhulga hinnang kolloid kulla meetodil (Joonis 6; HEK293 rakuliin; 2 h ja 6 h; rada 4 ja 5 vs rada 1). HEK293 rakuliini puhul on ilmselt H₂O₂-e 300 µM-ne kontsentratsioon piisavalt kõrge, et suunata rakke apoptoosi minema. 1000 µM-i juures on rakud juba suremas, mistõttu on valgu üldhulk tunduvalt väiksem. Võib arvata, et apoptootilistes rakkudes on NRF2-e tase madal, kuna NRF2 ise aktiveerib antiapoptootilisi ja detoksifitseerivad geene (Itoh *et al.*, 1997; Thimmulappa *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2005), mille aktivatsioon rakusurma puhul pole enam asjakohane. Teadupäraselt aktiveeruvad apoptootilises rakus kaspaaside nimelised porteasid, mis lagundavad terve hulga erinevaid rakulisi valke ning seeläbi käivitavad apoptoosi (Li & Yuan, 2008). Siiani pole küll näidatud, et NRF2 oleks üheks kaspaaside substraadiks, kuid antud aktivatsioonimustri alusel võiks sellekohast spekulatsiooni tõstatada küll. HaCat ja HPEK rakuliini rakud olid stressi suhtes vastupidavamad ning säilitasid üldjoontes sama raku hulga ka pikemates ajapunktides. Saadud info põhjal võib järeldada, et söötmesse lisatud H₂O₂-e poolt indutseeritud efekt NRF2-e aktiveerimisele ja stabiliseerimisele on kiire ja lühiajaline.

2.3.2. tBHQ ja DEM-i efekt NRF2-e aktivatsioonile on aeglane ja püsiv

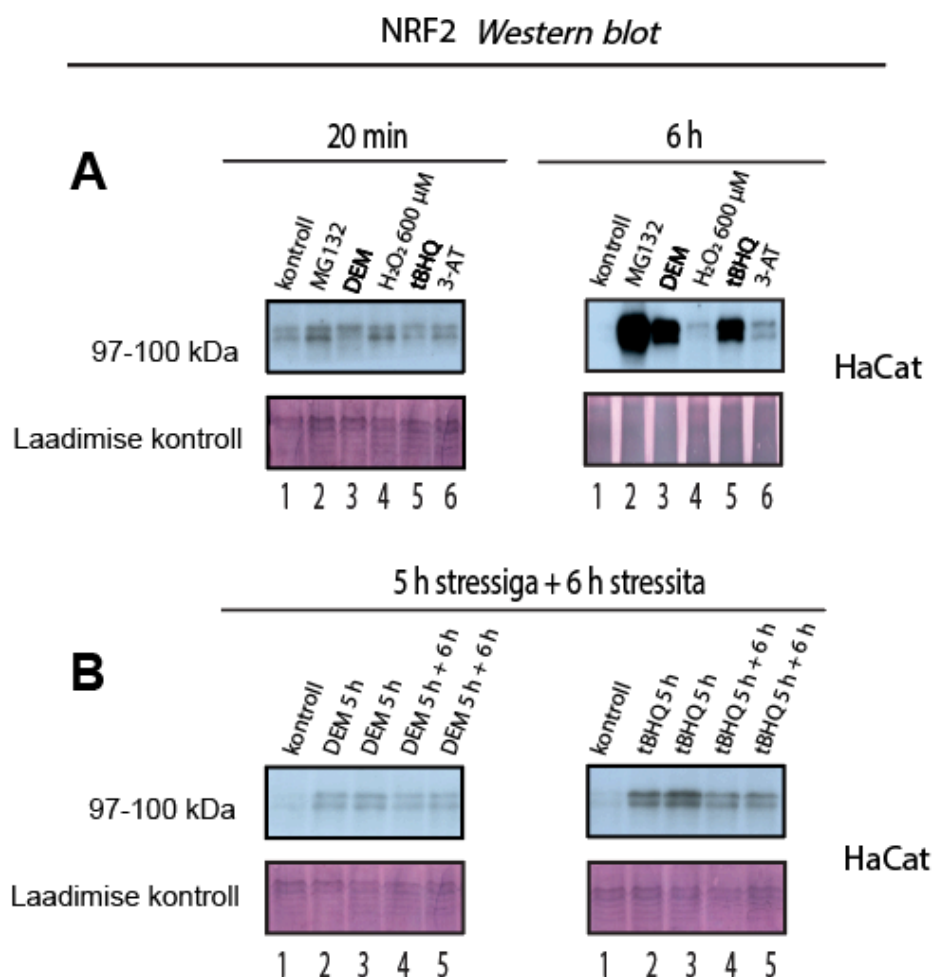
Eelmises katseskeemis selgus, et NRF2 aktiveerub peaaesjalikult vaid madalate vesinikperoksiidi kontsentratsioonide ja lühikeste inkubatsiooniaegade juures. See oli mõnevõrra ootamatu tulemus, kuna mitmed varasemad tööd on näidanud, et NRF2-e aktivatsioon toimub ka kõrgemate kontsentratsioonide ja pikemate ajapunktide korral. Näiteks Saito *et al* (2015) saavutasid selge NRF2-e aktivatsiooni ka 3 tunnise inkubatsiooniaja ja 400 µM H₂O₂-ga. Sellist tulemust antud töös aga ei saavutatud, mistõttu otsustati H₂O₂-e kõrval võrdlusesse lisada ka laiemini kasutatud ja oluliselt paremini kirjeldatud NRF2-e aktivaatorid. Seega võeti järgmises katseskeemis NRF2-e aktivaatoritena kasutusele ksenobiootikumid *tert*-butüülhüdrokinoon (tBHQ) ja dietüülmaleaat (DEM). Peamiseks eesmärgiks oli võrrelda NRF2-e aktivatsiooni ajalist dünaamikat vähem kasutatava H₂O₂-e ja sageli kasutatavate ksenobiootiliste induktorite tBHQ ja DEM-i vahel. Lisahuvi pakkus tõsiasi, et nii tBHQ kui ka DEM on kasutusel toiduainetööstuses säilitusaine ja antioksüdandina (Sheftel, 2000) ning antud ühendite ülemäärane tarbimine kutsub rakus samuti esile oksüdatiivset stressi (Weber *et al.*, 1990; Schilderman *et al.*, 1995). Seetõttu on oluline uurida ka nende ühendite poolt indutseeritavat KEAP1-NRF2 aktivatsioonimustrit, kuna see võib peegeldada ksenobiootilise stressi vastast kaitset üldisemalt. Lisaks võib tBHQ kasutamine NRF2 aktivaatorina anda infot ka endogeensete hüdrokinoonide klassi kuuluvate ühendite kohta. Endogeenseid hüdrokinoone on rakus mitmeid, näiteks närvikoes asuv dopamiin või suguhormoonide hulka

kuuluv 4-hüdroksü östradiol, mis võivad reguleerida antioksidantsete geenide ekspressiooni vastavalt närvikoes ja piimanäärmetes (Wang *et al.*, 2010). Erinevaid tBHQ ja DEM-i kontsentratsioone on meie laboris juba varem kasutatud (Tamberg *et al.*, 2018), seega antud katse tarbeks valiti välja maksimaalsed kontsentratsioonid, mis kutsuvad esile oksüdatiivset stressi, kuid ei põhjusta üleliigseid toksilisi efekte. Lisaks kasutati positiivse kontrollina ka 3-amino-1,2,4-triasooli (3-AT) ja MG132-te. 3-AT on herbitsiidina kasutatav katalaasi inhibiitor, mis tõstab endogeenset vesinikperoksiidi taset (Walton & Pizzitelli, 2012). MG132 põhjustab aga spetsiifilist 26S proteasoomi inhibitsiooni (Sahni *et al.*, 2008) ja blokeerib NRF2-e lagundamise selle poolt. 3-AT kasutamine annab võimaluse võrrelda aktiveerunud NRF2-e taset, mis on indutseeritud kas eksogeenselt lisatud H₂O₂-e või endogeenselt kuhjunud H₂O₂-e poolt. MG132-e kasutamine annab aga võimaluse näha, milline oleks maksimaalne võimalik NRF2 taseme tõus, kui tema degradatsioon rakkudes täielikult blokeerida.

Esmalt hinnati tBHQ ajalisi efekti võrdluses H₂O₂-ga. Selle tarbeks inkubeeriti rakke kas erinevate H₂O₂-e kontsentratsioonide või 50 µM tBHQ-ga 20 minuti, 2 tunni ja 6 tunni vältel. Võrdluse tulemusel oli näha, et tBHQ mõjul hakkab NRF2 stabiliseeruma alles 2 tunnise inkubatsiooniaja järel ning kasvab aja möödudes (Joonis 6; 20 min; 2 h; 6 h; rada 6 vs rada 1). Muster oli sama kõigis kolmes rakuliinis, kuid kõige tugevam NRF2-e aktivatsioon, mis viitab ulatuslikumale stressile, esines HEK293 rakuliini rakkudes, mistõttu tundub, et antud rakuliin on tundlikum tBHQ töötlusele, kui HPEK või HaCat. Järgmisena võeti tBHQ ja H₂O₂-e kõrval kasutusse ka DEM, 3-AT ja MG132 ning võrreldi kõikide kemikaalide ajalisi efekti 20 minutilise ja 6 tunnise inkubatsiooniaja juures. Antud katseskeemis otsustati kasutada vaid HaCat rakuliini rakke, kuna vastavas rakuliinis tulid NRF2-e aktivatsiooni efektid kõige selgemini esile. H₂O₂-e puhul võeti kasutusse 600 µM kontsentratsioon.

3-AT tõstab endogeenset H₂O₂-e taset ning tundub, et aktiveerib 20 minuti ajapunktis NRF2-te sarnaselt eksogeenselt lisatud H₂O₂-ga (Joonis 7A; 20 min; rada 6 vs rajad 1 ja 4). 6 tunni ajapunktis on 3-AT poolne NRF2-e aktiveerimine püsiv (Joonis 7A; 6 h; rada 6 vs rada 1), aga natuke suurem kui 600 µM H₂O₂-ga (Joonis 7A; 6 h; rada 6 vs rada 4), mis on loogiline, kuna kui 6 tunni möödudes on H₂O₂ tõenäoliselt enamjaolt neutraliseeritud, siis 3-AT poolne katalaasi inhibeerimine on jätkuv. Samas on 3-AT efekt siiski üsna nõrk, kuna rakus on ka teisi ensüüme, näiteks superoksiidi dismutaasi, mille töö ei ole inhibeeritud. Alternatiivsed ensüümid saavad üleliigset H₂O₂-te neutraliseerida, mistõttu rakusisene vesinikperoksiidi tase ei tõuse liigselt toksilisele tasemele ega kutsu esile suurt NRF2-e aktivatsiooni. Kuna

NRF2-e eluiga on normaalses tingimustes vaid ca 10-20 minutit (Itoh *et al.*, 2003) siis on valgu kuhjumine MG132-e toimetel nähtav juba 20 minutilise inkubatsiooniaja juures ning kasvab jõudsalt saavutades väga suure taseme 6 tunni möödudes (Joonis 7A; 20 min, 6 h; rada 2 vs rada 1).



Joonis 7. NRF2-e aktivatsioon ksenobiootiliste induktoritega – tBHQ ja DEM-i efekt rakus on aeglane ja püsiv. Joonisel on näha totaalvalgu *Western blot* analüüs NRF2 vastase antikehaga (kaksikbänd 97–100 kDa). Üldise valgutaseme hindamiseks on lisatud ka kolloid kullaga värvitud membraanid (laadimise kontroll). Analüüsiks kasutati HaCat rakuliini rakke, mida inkubeeriti 5 erineva kemikaaliga (MG132 20 μM, DEM 100 μM, H₂O₂ 600 μM, tBHQ 50 μM, 3-AT 20 μM) ajalise efekti hindamiseks kas 20 minutit või 6 tundi (A). tBHQ ja DEM-i efekti pööratavuse hindamiseks inkubeeriti rake 5 tunni jooksul tBHQ või DEM-i lahusega, misjärel rakud kas koguti (rajad 2 ja 3) või aspireeriti sööde, pesti rakud 1x PBS-iga, lisati puhas sööde ning inkubeeriti täiendavalt 6 tundi (rajad 4 ja 5) (B).

Eelmise katsega sarnaselt tõusis NRF2-e tase H₂O₂-e toimetel vaid varasemas ajapunktis ning oli 6 tunni möödudes langenud (Joonis 7A; 20 min; 6 h; rada 4 vs rada 1). Kuna H₂O₂-e poolt indutseeritud NRF2-e aktivatsioon pika inkubatsiooniaja korral on tunduvalt nõrgem maksimaalsest NRF2-e kuhjumisest MG132-ga (Joonis 7A; 6 h; rada 4 vs rada 2), siis võib kindlalt väita, et vesinikperoksiidi pikaajaline efekt KEAP1-NRF2 rajale on nõrk. Pikemas

ajapunktis oli tugevat NRF2-e stabilisatsiooni näha MG132-e kõrval vaid tBHQ ja DEM-ga (Joonis 7A; 6 h; rajad 3 ja 5 vs rada 1). Seega tundub, et need kaks stressorit käituvad sarnase mustri alusel – mõlema efekt on aeglane. Kuna NRF2-e aktivatsioon tBHQ ja DEM-iga on võrreldav MG132-ga, siis võib kindlalt väita, et kumbki induktor kutsub esile efektiivset NRF2-e aktivatsiooni (Joonis 7A; 6 h; rajad 3 ja 5 vs rada 2).

Uurimaks tBHQ ja DEM-i efekti pööratavust, teostati katse, kus rakke inkubeeriti tBHQ või DEM-i lahusega 5 tunni vältel. Seejärel pesti rakud 1x PBS-iga, vahetati stressoreid sisaldav sööde puhta söötme vastu ning inkubeeriti täiendavalt 6 tundi. Katse eesmärk oli vaadata, kas taastumisperioodil NRF2-e kuhjumine säilib, väheneb või kaob täielikult, mis kirjeldaks tBHQ ja DEM-i poolt indutseeritud NRF2-e vastuse pööratavust pärast induktori enda eemaldamist. Tulemustest oli näha, et NRF2-e tase langes peale 6 tunnist taastumisperioodi (Joonis 7B; rajad 4 ja 5 vs rajad 2 ja 3), kuid säilitas siiski oluliselt kõrgema taseme võrreldes töötlemata rakkudega (Joonis 7B; rajad 4 ja 5 vs rada 1). Seega võib katse tulemustest järeldada, et erinevalt H₂O₂-st avaldub tBHQ ja DEM-i efekt pikemaajalise mõjutamise jooksul ja on püsivam.

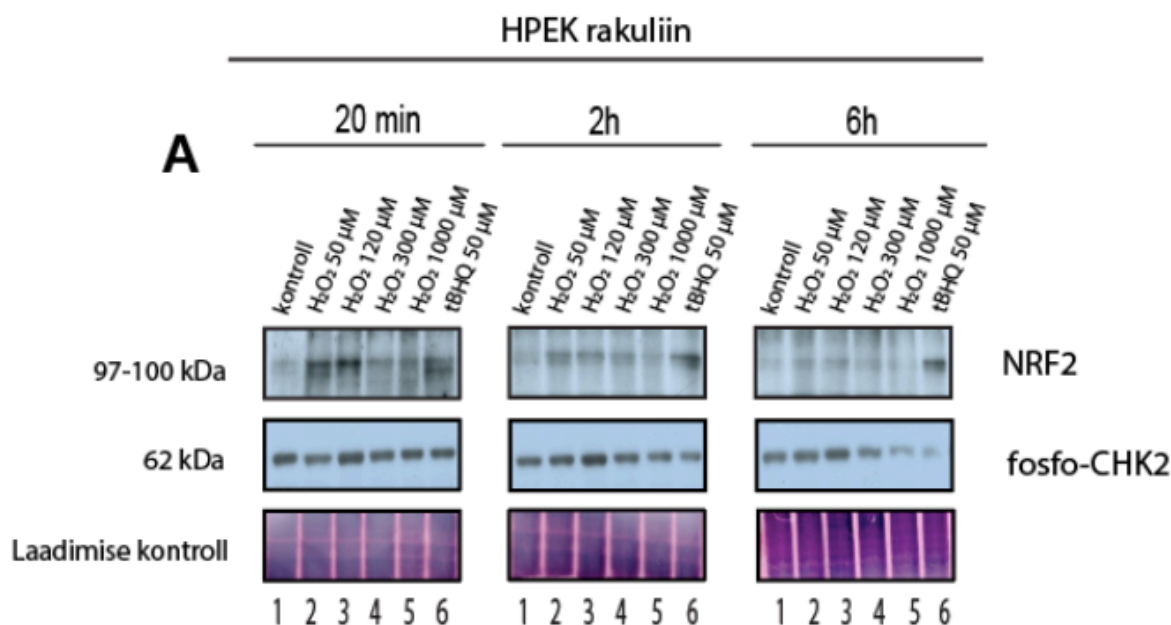
2.3.3. CHK kinaaside ja KEAP1-NRF2 poolt kontrollitavad oksüdatiivse stressi vastusrajad on üksteisest sõltumatud

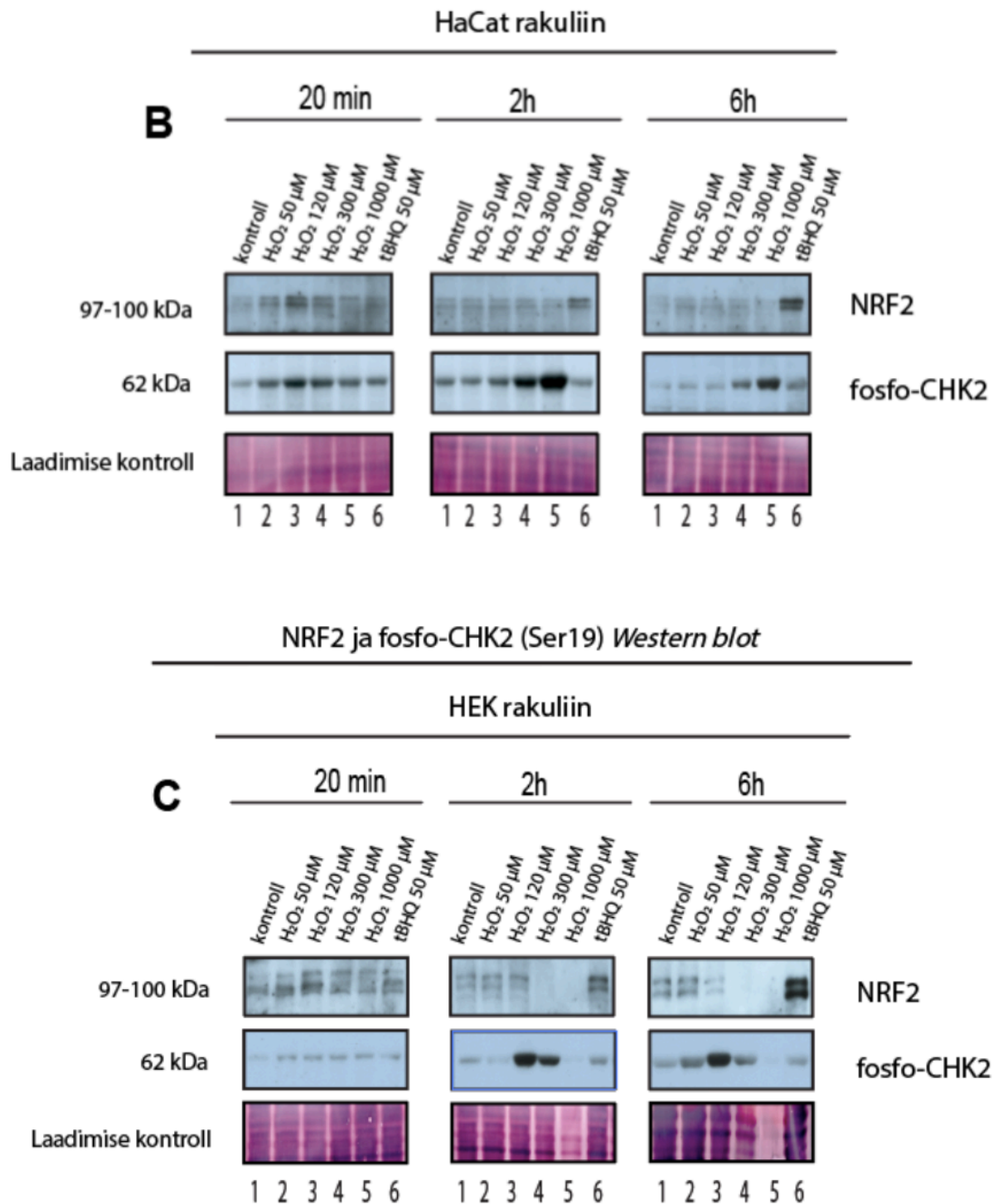
DNA kahjustuste ja oksüdatiivse stressi korral aktiveerub lisaks KEAP1-NRF2 rajale ka ATM-CHK2 ja/või ATR-CHK1 rada. Algselt testisime CHK radade aktivatsiooni oma katsetes positiivse kontrollina nägemaks kas kasutatavad vesinikperoksiidi kogused olid piisavad rakusiseste kahjustuste tekitamiseks. Kui see fakt sai kinnitatud, siis tahtsime näha, kas NRF2-e aktivatsioon ja CHK1/CHK2 vastuse dünaamika on sarnane. Selle tarbeks tegime esmalt H₂O₂-e aja ja kontsentratsiooni tiitrimise katse proovidega CHK2 *Western blot* analüüsi antikehadega, mis tunnevad ära vaid aktiveerunud CHK2 valke, antud juhul CHK2 valku, mis on fosforüleeritud saidist Ser19.

On näha, et sarnaselt NRF2-le on ka CHK2 vastus rakuliinilt erinev. HPEK rakkude puhul ei ole oksüdatiivsest stressist sõltuvat CHK2-e aktivatsiooni näha, see tähendab aktiveeritud CHK2 tase on võrreldav nii kontrollrakkudes kui ka H₂O₂-e ja tBHQ-ga töödeldud rakkudes (Joonis 8A; fosfo-CHK2 vastane antikeha; 20 min, 2 h, 6 h; rajad 2, 3, 4, 5, 6 vs rada 1). HaCat rakuliini *Western blot* analüüsist aga selgub, et CHK2 aktiveerub nõrgalt madalate ja keskmiste H₂O₂-e kontsentratsioonide juures (50 µM, 120 µM ja 300 µM) 20 minuti

ajapunktis (Joonis 8B; fosfo-CHK2 vastane antikeha; 20 min; rajad 2, 3 ja 4 vs rada 1), see korreleerub NRF2 vastusega (Joonis 8B; NRF2 vastane antikeha; rajad 2, 3 ja 4 vs 1). 2–6 tunnise inkubatsiooniaja möödudes langeb 50 μM ja 120 μM H_2O_2 -ga inkubeeritud rakkudes CHK2-e vastus tagasi kontrollrakkudega ühele tasemele (Joonis 8B; fosfo-CHK2 vastane antikeha; 2 h ja 6 h; rajad 2 ja 3 vs rada 1). Kuna on teada, et rakkudes on mitmeid mehhanisme endo- ja eksogeense vesinikperoksiidi neutraliseerimiseks ning antud protsess on üsna kiire (Gülden *et al.*, 2010), siis võib eeldada, et madalad H_2O_2 -e kontsentratsioonid aktiveerivad CHK2-te vaid lühiajaliselt. Pikema aja möödudes on ilmselt H_2O_2 -e tase ning selle poolt tekkinud kahjustuste ulatus liialt madal selleks, et kutsuda esile CHK2-e aktivatsiooni ka 2 tunni ja 6 tunni ajapunktis. Kõrgemad H_2O_2 -e kontsentratsioonid (300 μM ja 1000 μM) aktiveerivad CHK2-te aga ka 2–6 tunnise inkubatsiooniaja möödudes (Joonis 8B; fosfo-CHK2 vastane antikeha; 2 h ja 6 h; rajad 4 ja 5 vs rada 1) ning suuremal määral kui 50 μM ja 120 μM H_2O_2 20 minuti jooksul. Tõenäoliselt on antud kontsentratsioonid ning rakkudes tekitatud kahju piisavalt suured, et avaldada efekti hilisemates ajapunktides. Võib eeldada, et sedavõrd kõrgest oksüdatiivsest stressist ei ole rakud enam võimelised taastuma ning vajadus CHK2-e aktivatsiooni järele on suur. Aktiveerunud CHK2 suunab pöördumatu kahju korral rakutsükli aresti ning kutsub esile apoptoosi (Hirao *et al.*, 2002).

NRF2 ja fosfo-CHK2 (Ser19) Western blot



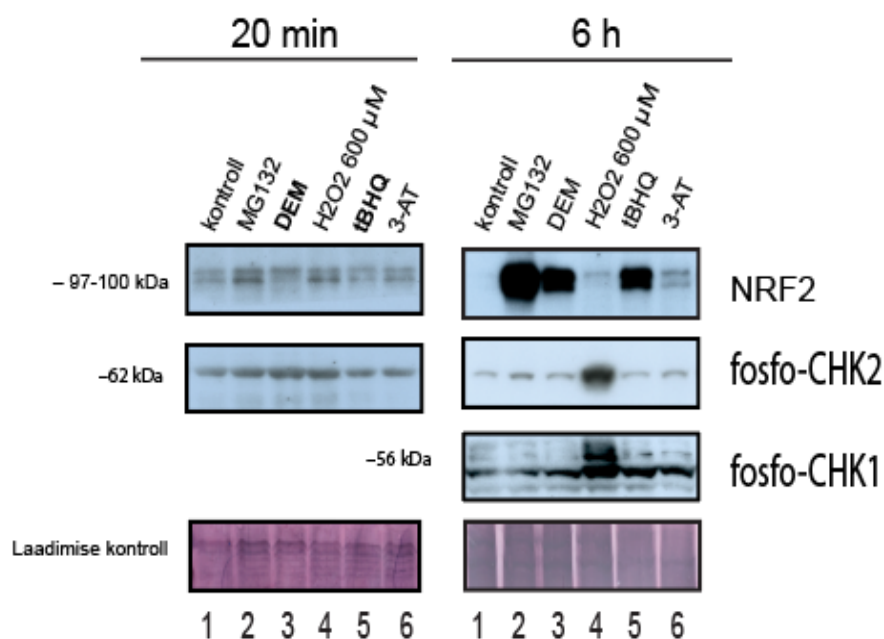


Joonis 8. CHK2 ja NRF2 radade aktivatsiooni võrdlemine rakkude töötlemisel H₂O₂-e ja tBHQ-ga – radade aktivatsioon on teineteisest sõltumatu. Joonisel on näha totaalvalgu *Western blot* analüüs NRF2 (kaksikbänd 97–100 kDa) või fosfo-CHK2(Ser19) (62 kDa) vastase anti kehaga. NRF2 *Western blot* pilt on sama mis Joonis 6-s ning on lisatud mugavama võrdluse eesmärgil. Üldise valgu taseme hindamiseks on lisatud ka kolloid kullaga värvitud membraanid (laadimise kontroll). Analüüsiks kasutati HPEK, HaCat ja HEK293 rakuliini rakke, mida inkubeeriti nelja erineva H₂O₂-e kontsentratsiooni (50 μM, 120 μM, 300 μM ja 1000 μM) või 50 μM tBHQ lahusega 20 minuti, 2 tunni või 6 tunni vältel. Tulemused kordusid kahes eraldiseisvas katses kõigi kolme rakuliini puhul.

HEK293 rakkude puhul pole erinevalt HaCat rakkudest 20 minuti ajapunktis CHK2-e aktivatsiooni näha ühelgi H₂O₂-e kontsentratsioonil (Joonis 8C; fosfo-CHK2 vastane antikeha; 20 min; rajad 2, 3, 4, 5 ja 6 vs rada 1), mis viitab sellele, et HEK293 rakuliinis on CHK2 stressivastus ilmselt natuke aeglasem. CHK2-e aktivatsioon esineb alles 2 tunni möödudes ning peaauglikult 120 µM ja 300 µM H₂O₂-e juures (Joonis 8C; fosfo-CHK2 vastane antikeha; 2 h; rajad 3 ja 4 vs rada 1). 6 tunni möödudes on CHK2-e aktivatsioon jätkuvalt kõrge ja lisaks ka 50 µM H₂O₂-e juures (Joonis 8C; fosfo-CHK2 vastane antikeha; 6 h; rajad 2, 3 ja 4 vs rada 1). 1000 µM H₂O₂-e lahusega inkubeeritud rakkudes ei ole 2–6 tunnise inkubatsiooniaja möödudes ei NRF2-e ega CHK2-e aktivatsiooni näha (Joonis 8C; NRF2 ja fosfo-CHK2 vastane antikeha; 2 h ja 6 h; rada 5 vs rada 1). Põhjus on ilmselt selles, et antud rakuliin on sedavõrd suure H₂O₂-e taseme suhtes väga tundlik ja liigub kiiremini apoptoosi või nekroosi, kui HaCat või HPEK rakuliin. Seda peegeldab ka valgu üldtaseme tugev langus laadimise kontrollis (Joonis 8C; laadimise kontroll; 2 h ja 6 h; rada 5 vs rada 1). Erinevalt H₂O₂-st ei aktiveeri tBHQ CHK2-te üheski ajapunktis ei HPEK, HaCat ega HEK293 rakuliinis (Joonis 8ABC; 20 min, 2 h, 6 h; rada 6 vs rada 1).

Järgmisena uuriti tBHQ ja H₂O₂-e kõrval ka DEM, MG132 ja 3-AT efekti CHK vastusraja aktivatsioonile. Otsustati kasutada vaid 20 minuti ja 6 tunni ajapunkte ning HaCat rakuliini rakke, kuna antud liini rakkudes tulid efektid kõige paremini esile. H₂O₂-e kontsentratsioon langetati 600 µM-ni vältimaks liigseid toksilisi efekte. Nüüd teostati nii CHK2 kui ka CHK1 *Western blot* analüüs, kus kasutati kas fosfo-CHK2(Ser19) või fosfo-CHK1(Ser317) vastaseid antikehi. On näha, et vaid H₂O₂ aktiveerib CHK1 ja CHK2 rada ning seda ainult hilisemas ajapunktis (Joonis 9; fosfo-CHK1 ja fosfo-CHK2 vastane antikeha; 6 h; rada 4 vs rada 1). Ksenobiootikumid tBHQ ja DEM, katalaasi inhibiitor 3-AT ning proteasoomi inhibiitor MG132 ei näi omavat mingit CHK1/CHK2-te aktiveerivat efekti (Joonis 9; fosfo-CHK1 ja fosfo-CHK2 vastane antikeha; 6 h; rada 2, 3, 5 ja 6 vs rada 1).

HaCat rakuliin *Western blot*

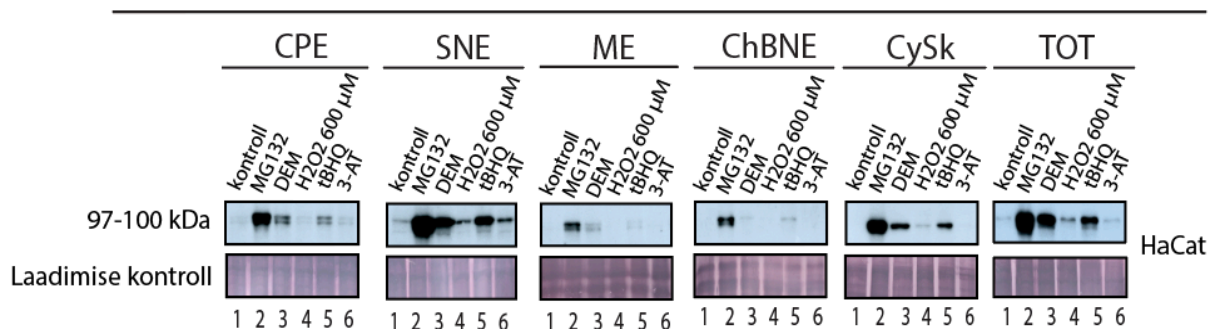


Joonis 9. CHK1/CHK2 ja NRF2 radade aktivatsiooni võrdlemine rakkude töötlemisel H₂O₂-e ja ksenobiootikumidega – CHK rajad aktiveeruvad H₂O₂-e spetsiifiliselt. Joonisel on näha totaalvalgu *Western blot* analüüs fosfo-CHK2(Ser19) vastase antikehaga (62 kDa) ning lisaks lahustuva tuuma fraktsiooni (SNE) *Western blot* analüüs fosfo-CHK1(Ser317) vastase antikehaga (56 kDa). Mugavama võrdluse eesmärgil on lisatud ka NRF2 *Western blot* pilt varasemast eksperimendist (Joonis 7). Üldise valgu taseme hindamiseks on lisatud ka kolloid kullaga värvitud membraanid (laadimise kontroll). Analüüsiks kasutati HaCat rakuliini rakke, mida inkubeeriti 5 erineva mõjuriga (MG132 20 µM, DEM 100 µM, H₂O₂ 600 µM, tBHQ 50 µM, 3-AT 20 µM) ajalise efekti hindamiseks kas 20 minuti või 6 tunni vältel. Tulemused kordusid kahes eraldiseisvas katses.

2.3.4. Stabiliseerudes lokaliseerub NRF2 kasutatud induktorist hoolimata üle kogu raku

Nagemaks, kas NRF2 koguneb stabiliseerudes mõnda kindlasse rakustruktuuri ja kas see on induktorist sõltuv, võeti kasutusele *Thermo Scientific*'u poolt välja töötatud rakkude fraktsioneerimise protokoll (*Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells*), mis eraldab rakud viieks erinevaks fraktsiooniks: tsütoplasma (CPE), membraani (ME), lahustuva tuuma (SNE), kromatiiniga seotud tuuma (ChBNe) ning tsütoskeleti (CySk) fraktsiooniks. Erinevate oksüdatiivse stressi indutseerijate võrdluseks kasutati ka antud katses H₂O₂-e kõrval ksenobiootikume tBHQ ning DEM-i, positiivse kontrollina oli juures proteasoomi inhibiitor MG132 ja katalaasi inhibiitor 3-AT. Katse teostati vaid 6 tunnise ajapunktiga, kuna eelnevad katsed näitasid, et alles pikema inkubatsiooniajaga on ksenobiootilise stressi vastast NRF2-e aktivatsiooni selgelt näha (Joonis 6 ja 7).

NRF2 6h Western blot



Joonis 10. Aktiveerunud NRF2 lokaliseerub üle kogu raku. Joonisel on näha tsütoplasma (CPE), lahustuva tuuma (SNE), membraani (ME), kromatiiniga seotud tuuma (ChBNe) ja tsütoskeleti (CySk) fraktsioonide ning totaavalgu (TOT) *Western blot* analüüs NRF2 vastase antikehaga (kaksikbänd 97–100 kDa). Üldise valgu taseme hindamiseks on lisatud ka kolloid kullaga värvitud membraanid (laadimise kontroll). Analüüsiks kasutati HaCat rakuliini rakke, mida inkubeeriti 5 erineva kemikaaliga (MG132 20 μM, DEM 100 μM, H₂O₂ 600 μM, tBHQ 50 μM, 3-AT 20 μM) 6 tunni jooksul. Tulemused kordusid kahes eraldiseisvas katses.

Varasemalt on väidetud, et aktiveerudes koguneb NRF2 vaid tuuma (Iso *et al.*, 2016) ja seda üsna kiiresti (Watai *et al.*, 2007). Fraktsioonide analüüsil selgus, et aktiveerudes tõuseb NRF2-e tase aga kõikides rakulistes kompartmentides. Kõige tugevamalt koguneb aktiveerunud NRF2 siiski just lahustuva tuuma fraktsioonis (Joonis 10; SNE vs CPE, ME, ChBNE, CySk). Selline ümberlokaliseerumine on kooskõlas eelnevalt kirjeldatud NRF2-e stabiliseerumisele järgneva tuuma translokeerumise ning ARE sõltuvate geenide aktivatsiooniga (Itoh *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 2005). Aktiveerunud NRF2 lokaliseerub selgelt üle kogu raku MG132, DEM, tBHQ-ga (Joonis 10; rajad 2, 3 ja 5 vs rada1). Kuna H₂O₂-e poolne NRF2-e aktivatsioon 6 tunnise inkubatsiooniajaga on üsna nõrk, siis ei saa kindlalt väita, kas lokaliseerumise muster oleks sama ka H₂O₂-e puhul. See vajab täiendavat kinnitust edasiste katsete näol. Kõige suuremat valgu kuhjumist põhjustab proteasoomi inhibiitor MG132 (Joonis 10; rada 2 vs rada 1), tBHQ ja DEM-i poolne NRF2 kuhjumine on madalam (Joonis 10; rajad 3 ja 5 vs rajad 1 ja 2), mis viitab sellele, et ka maksimaalses kontsentratsioonis ei suuda DEM ja tBHQ NRF2-te täielikult stabiliseerida.

2.4. Arutelu

Antud uurimistöö põhieesmärk oli paika panna tingimused KEAP1-NRF2 oksüdatiivse stressi vastusraja aktivatsiooni uurimiseks koekultuuri rakkudes. Sellele läheneti metodoloogiliselt: võeti kasutusele erinevad oksüdatiivse stressi indutseerijad, rakuliinid ja inkubatsiooniajad ning vesinikperoksiidi puhul ka kontsentratsioonid. Peasjalikult sooviti teada saada, kas ja kuidas erineb NRF2-e aktivatsioon H_2O_2 -e ja erinevate ksenobiootiliste stressoritega (tBHQ, DEM). Kuigi H_2O_2 mimikeerib rakusisest ROS-ide kuhjumist kõige paremini, pole üllataval kombel seda eelnevalt eriti kasutatud KEAP1-NRF2 raja aktiveerimiseks. Nendes eksperimentaalsetes töodes, kus seda tehtud on, on kasutatavad tingimused nagu näiteks inkubatsiooniajad ja kontsentratsioonid olnud üsna vastuolulised ja ebaselged. Kui mitmetes töodes on kasutatud suhteliselt kõrgeid kontsentratsioone ja pikki inkubatsiooniaegu siis teistes on jällegi kirjeldatud lühiajalist KEAP1-NRF2 vastust madalamate kontsentratsioonidega. Selline ebakõla kirjanduses ning soov paika panna täpsed tingimused, mille alusel planeerida edasisi eksperimentaalseid lähenemisi ka KEAP1-MCM3 interaktsiooni rolli uurimiseks kannustas antud uurimistöö ettevõtmist.

Käesolevas töös läbiviidud katsete põhjal võib öelda, et H_2O_2 ning ksenobiootikumid tBHQ ning DEM aktiveerivad NRF2-te erinevalt. H_2O_2 -e poolne NRF2-e stabiliseerimine on kiire, lühiajaline ja pöörduv (Joonis 6). tBHQ ja DEM-i poolt esilekutsutud NRF2-e stabiliseerumine on seevastu aeglane ning efekt pikaajalisem (Joonis 7A ja 7B). Kui H_2O_2 -ga inkubeerides toimus NRF2-e aktivatsioon juba 20 minuti jooksul ning langes seejärel kiirelt, siis tBHQ ja DEM kutsusid NRF2-e aktivatsiooni esile alles alates 2 tunnise inkubatsiooniaja möödumisel ning stabiliseerumine püsis ka pärast induktori eemaldamist (Joonis 7B). Positiivse kontrollina kasutusele võetud ksenobiootiline katalaasi inhibiitor 3-AT mõjutab NRF2-te sarnaselt H_2O_2 -ga. Analoogselt eksogeense vesinikperoksiidi lisamisega on ka 3-AT poolt tekitatud endogeense H_2O_2 -e kuhjumisel põhinev NRF2-e aktiveerimine üsna nõrk ja lühiajaline. Tõenäoliselt ei ole ainuüksi katalaasi inhibeerimine piisav, et endogeense vesinikperoksiidi tase üle kriitilise läve tõuseks ja tugeva NRF2-e aktivatsiooni esile kutsuks. Inhibeeritud katalaasi tööd tasakaalustavad arvatavasti alternatiivsed H_2O_2 -e ja teiste vabade radikaalide neutraliseerijaid, mis üleliigsest H_2O_2 -st kiirelt vabanevad. Üks põhjus, miks H_2O_2 -e efekt NRF2-e stabiliseerimisele on kiire ja lühiajaline ongi ilmselt selles, et H_2O_2 tekib endogeenselt ka homoöstaatilises seisundis, mistõttu on raku tekkinud väga mitmeid erinevaid spetsialiseerunud kaitseradasid H_2O_2 -e ja teiste ROS-ide poolsete kahjustuste vältimiseks. Selle tõttu neutraliseeritakse H_2O_2 raku väga kiiresti ning NRF2-e aktivatsiooni

võib näha vaid lühiajaliselt ja üsna nõrgalt. Samuti panustab efekti lühiajalisusesse ilmselt ka see, et nii vesinikperoksiid kui ka teised ROS-id on keemiliselt ebastabiilsed ja üsna lühikese poolestusajaga.

Teine põhjus, miks H₂O₂ ja tBHQ ning DEM erinevalt käituvad on ilmselt selles, kuidas antud stressorid KEAP1-e tsüsteiinijääke mõjutavad. Endogeensed oksüdandid, nagu H₂O₂, põhjustavad tsüsteiinijääkide oksüdatsiooni ja KEAP1-e monomeeride siseseid ja vahelisi disulfiidsildu (Fourquet *et al.*, 2010). H₂O₂ on võimeline KEAP1-te oksüdeerima väga kiiresti. Näiteks Fourquet *et al.* (2010) on näidanud, et KEAP1-e oksüdatsioon on maksimaalsel tasemel juba 5 minutit pärast inkubatsiooni 200 µM H₂O₂-ga ja langeb taas basaalolekusse 40 minuti möödudes. Ksenobiootilised elektrofiilid nagu tBHQ ja DEM modifitseerivad tsüsteiinijääke aga läbi alküleerimise ning muudavad sellega KEAP1-e konformatsiooni ja lubavad NRF2-l stabiliseeruda (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Fourquet *et al.*, 2010). Lisaks on varasemalt paika pandud, et *tert*-butüülhüdrokinoon (tBHQ) oksüdeerub raku jõudes endogeenste Cu²⁺ katalüsaatorite vahendusel *tert*-butüülkinooniks (tBQ) (Wang *et al.*, 2010). Alles tekkiv tBQ saab KEAP1-e tsüsteiinijääkidega reageerida ja NRF2-e stabiliseerumist esile kutsuda (Wang *et al.*, 2010). Selline oksüdatsioon hüdrokinoonist kinooniks ongi NRF2-e aktivatsiooni kiirust limiteeriv etapp. Samuti on paika pandud, et tBHQ ja DEM kuuluvad I klassi KEAP1 aktivaatorite hulka, mis vajavad BTB domeenis olevat Cys151-e KEAP1-e aktiveerimise jaoks (Wada *et al.*, 2008; Takaya *et al.*, 2012). H₂O₂ seevastu kuulub IV klassi KEAP1 aktivaatorite hulka, mille liikmed on KEAP1-e aktivatsioonil nii Cys151, Cys273 kui ka Cys288 sõltumatud (Saito *et al.*, 2015). Seni pole tuvastatud, millised võiksid olla need tsüsteiinijäägid, mille olemasolu oleks kriitiliselt vajalik Cys151/Cys273/Cys288 sõltumatute stressi indutseerijate poolseks KEAP1 aktivatsiooniks. Eksisteerib võimalus, et vesinikperoksiidi poolne NRF2-e aktiveerimine ei käigi KEAP1-e tsüsteiinide vahendusel, vaid hoopis mingi muu mehhanismi kaudu. Samas on välja pakutud, et Cys226, Cys613 (Hourihan *et al.*, 2012) ja Cys434 (Fujii *et al.*, 2010) võiksid samuti olla olulised tsüsteiinijäägid oksüdatiivse stressi ära tundmisel. Selle kinnitamiseks on leitud, et H₂O₂ põhjustab intramolekulaarseid disulfiidsidemeid just KEAP1-e Cys226 ja Cys613-e vahel (Fourquet *et al.*, 2010; Hourihan *et al.*, 2012). Huvitaval kombel on täheldatud, et H₂O₂ tekitab lisaks ka disulfiidsideme kahe KEAP1 molekuli vahel läbi Cys151-e (Fourquet *et al.*, 2010). Seega on siin veel palju ebaselgust ja vastuseta küsimusi. Välja on pakutud tsüsteiini koodi hüpotees, kus iga oksüdant või elektrofiil eelistab teatud tsüsteiinijääki(e) ning erinevate muustrite järgi modifitseeritud tsüsteiinijäägid kutsuvad esile erinevaid bioloogilisi efekte

rakus (Wada *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2015). Seda on näha ka antud uurimistöö katsetes, kus rakud reageerivad erinevatele stressoritele erineva KEAP1-NRF2 ja CHK1/CHK2 mustriaga.

CHK1 ja CHK2 on olulised kontrollpunkt kinaasid, mis aktiveeruvad DNA kahjustuste või oksüdatiivse stressi korral ning viivad rakutsükli aresti või pöördumatu kahju puhul initsieerivad apoptoosi (Liu *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000). Kui KEAP1-NRF2 rada aktiveerivad kõik töös kasutatavad stressi induktorid, siis CHK-sid aktiveerib vaid H₂O₂, ilmselt seetõttu, et vaid H₂O₂ kutsub esile DNA kahjustusi, mis on peamine CHK radade aktiveeriv signaal. Lisaks on H₂O₂ võimeline ATM kinaasi ka otse aktiveerima, oksüdeerides ATM-i reaktiivseid tsüsteiinijääke (Marcucci *et al.*, 2010). Sellisel juhul ei sõltuks ATM-CHK2 raja aktivatsioon vaid genoomsetest kahjustustest, vaid otse ROS-ide tasemest. Kuigi ATM kinaasi peamiseks sihtmärgiks on CHK2, on leitud tõendusi selle kohta, et ATM ja ATR kinaasil on üsna palju kattuvusi (Ozeri-Galai *et al.*, 2008), mistõttu võib eeldada, et ATM on võimeline aktiveerima ka CHK1-te. Üldjoontes paistab, et tingimustel, kus NRF2 on aktiivne, on CHK-de aktivatsioon minimaalne ja vastupidi. NRF2 aktiveerub pigem madalate H₂O₂-e kontsentratsioonide ja lühemate ajapunktide juures. CHK2 aktiveerub seevastu just suuremate H₂O₂-e tasemetega ja pikemate inkubatsiooniaegade korral. Tundub, et mõõduka ja lühiajalise oksüdatiivse stressi juures aktiveerub esmajärjekorras KEAP1-NRF2 stressivastus rada, mis tunneb ära vaid stressori olemasolu ning üritab seejärel detoksifitseerivate ja antiapoptootiliste geenide aktivatsiooni kaudu kahjustusi ennetada ja rakusisest olukorda normaliseerida. Tugevama ja pikemaajalise oksüdatiivse stressi korral jõuavad juba tekkida ka genoomsed kahjustused, mis aktiveerivad ATR ja ATM kinaase ning vallandavad CHK1 ja CHK2 stressivastuse. Kuna CHK1/CHK2 vastusrada initsieerib suure stressi korral rakutsükli aresti ja aktiveerib apoptootilisi valke (Hirao *et al.*, 2002), siis NRF2-e poolt initsieeritud antiapoptootiliste valkude süntees pole enam asjakohane ning NRF2-e aktivatsioon langeb. Lisaks sellele võib NRF2 potentsiaalselt olla üheks kaspasid poolt lagundamisele suunatud sihtmärkvalguks apoptootilises rakus, mis võiks samuti seletada NRF2-e taseme langust tugeva ja pikaajalise oksüdatiivse stressi korral. Kokkuvõtlikult võib väita, et antud uurimistöö katsete alusel on KEAP1-NRF2 ja CHK1/CHK2 stressivastusrajad teineteist sõltumatud ning kumbki rada järgib erinevat aktivatsiooni mustrit. Tundub, et KEAP1-NRF2 on pigem kahjustusi ennetav ning ROS-ide ja ksenobiootikumide neutraliseerimisele suunatud rada ning CHK1/CHK2 suuremate genoomsete kahjustuste tagajärgedega tegelev ja apoptoosi esile kutsuv vastusrada.

Töös uuriti ka H₂O₂-e ja teiste induktorite mõju NRF2-e stabiliseerumisega kaasnevale lokaliseerimisele. Kirjanduse kohaselt liigub aktivatsiooni korral *de novo* sünteesitud

NRF2 peaašnjalikult vaid tuuma ning alustab sealt ARE-sõltuvate geenide transkriptsiooni (Watai *et al.*, 2007). Varasemalt on näidatud, et KEAP1-e rakuline paigutus on stressist sõltumatu ja ei muutu NRF2-e stabiliseerimisega oksüdatiivse või elektrofiilse stressi korral ning lokaliseerub peaašnjalikult tsütoplasmas (Watai *et al.*, 2007). Antud töös on aga näha, et NRF2-e aktiveerumisega kaasneb NRF2 valgu taseme tõus kõikides raku osades, kuigi kõige kõrgemalt just tuuma struktuurides. Selline lokaliseerumise muutus tundub olevat induktorist sõltumatu, mis tähendaks seda, et NRF2-e akumulatsioon ei erine vastusena H₂O₂-e ja ksenobiootiliste NRF2 aktivaatoritega. Selle kindlamaks väitmiseks peaks tulevikus tegema korduskatseid, kuna H₂O₂-e poolne NRF2-e aktivatsioon oli antud katse tingimustes üsna nõrk. Aktiveerunud NRF2-e kuhjumine üle kogu raku on aga vastuolus varasema paradigmaga, mis postuleerib, et normaalolekus ankurdatakse KEAP1 NRF2-e tsütoskeletile ning suunab edasisse lagundamisse kuni NRF2-e aktiveerumiseni, mille järgselt transporditakse NRF2 erandlikult tuuma (Itoh *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 1999). Nii meie labori kui ka näiteks Watai *et al.* (2007) andmete kohaselt tundub, et KEAP1-te võib olla ka mujal raku sees ning samamoodi tundub olevat ka NRF2-ga. Huvitava tähelepanekuna võib välja tuua asjaolu, et kõige suuremat valgu kuhjumist üle kõigi fraktsioonide põhjustab proteasoomi inhibiitor MG132, mis inhibeerib spetsiifiliselt 26S proteasoomi tööd. Selle põhjal võib järeldada, et isegi maksimaalses lubatavas kontsentratsioonis ei suuda ei H₂O₂, DEM ega tBHQ NRF2-te täielikult stabiliseerida. See tähendab, et mingi hulk *de novo* sünteesitud NRF2-st jääb siiski KEAP1-ga seotuks ja suunatakse degradatsioonile. MG132-ga inhibeerides akumulatsioonile suunatud NRF2, mis on reguleeritud lisaks ka KEAP1-CUL3-E3 sõltumatute radade poolt, nagu näiteks CUL1/β-TrCP (Cuadrado *et al.*, 2011).

Viimasena võib välja tuua rakuliinide erinevused. Vesinikperoksiidi aja ja kontsentratsiooni tiitrimise katsetes kasutati kolme erinevat rakuliini: HaCat, HPEK ja HEK293. Oksüdatiivse stressi suhtes tundusid kõige tundlikumad olevat HEK293 rakuliini rakud. Seda peegeldas asjaolu, et vastavates rakkudes oli kõrgemate H₂O₂-e kontsentratsioonidega (300 μM ja 1000 μM) inkubeerides näha valgu totaalhulga langust, mis viitab stressist põhjustatud raku surmale. Seevastu keratinotsüütide rakuliinid HaCat ja HPEK olid vastupidavamad ning ei reageerinud oksüdatiivsele stressile sedavõrd nähtava raku surmaga. Kuna keratinotsüüdid asuvad epidermises, mille üks ülesannetest on olla kaitsev barjäär keha õrna sisekeskkonna ja “vaenuliku” väliskeskkonna vahel, siis võib eeldada, et need rakud on ka vastupidavamad oksüdatiivsele stressile olles pidevalt kontaktis ksenobiootiliste oksüdantide, keskkonnamürkide ja UV kiirgusega. Kuigi HaCat ja HPEK rakuliinid on mõlemad keratinotsüüdid, ei reageerinud nad stressile siiski päris samasuguse mustriga. Kui KEAP1-

NRF2 stressivastus oli võrdlemisi sarnane, siis CHK2 vastus oli üsna erinev. Nimelt kui HaCat rakuliinis toimus CHK2-e aktivatsioon H_2O_2 -e tulemusel, siis HPEK rakuliinis polnud CHK2-e aktivatsiooni näha. Seda erinevust võib mingil määral põhjustada asjaolu, et HaCat on immortaliseeritud püsirakuliin, mis on ilmselt läbinud teatavaid genotüübi ja fenotüübi muudatusi, mis võib mõjutada nende rakkude reaktsioone väliste mõjutuste suhtes. HPEK rakuliin seevastu on primaarne ning seetõttu on võib-olla vastupidavam sedasorti stressi suhtes või selles rakuliinis on mõned alternatiivsed stressirajad enamkasutatavad. Tundub, et HaCat rakuliinis on DNA kahjustustele reageerimisel peamine rõhk CHK2 rajal, kuid see vajab veel täiendavat uurimist.

Kokkuvõtvalt võib järeldada, et meie uurimislaboris sobiks KEAP1-NRF2 raja aktiveerimise uurimiseks kõige paremini kasutada mitte vesinikperoksiidi vaid tBHQ, DEM-i või muid ksenobiootikume, kuna vastavate induktorite efektid NRF2-e aktivatsioonile on selgemad, korduvad ja püsivad. Optimaalne inkubatsiooniaeg oleks 2–6 tunni vahemik ning sobivad kontsentratsioonid, mis olid juba varasemalt paika pandud, on 50 μ M tBHQ ja 100 μ M DEM-i jaoks. Kui kasutada H_2O_2 -te, siis vaid madalates kontsentratsioonides ($\leq 120 \mu$ M) ja lühemates ajapunktides (≤ 2 h), kuna peamised efektid NRF2-e stabilisatsioonile tulevad esile just antud tingimustel. KEAP1-NRF2 raja uurimisel on kindlasti asjakohane kasutada mitut erinevat rakuliini, kuna täpsed KEAP1-NRF2 vastusraja aktivatsioonimustrid tunduvad olevat eri rakuliinides erinevad. Antud uurimistöös kasutatud kolmest rakuliinist annavad kõige selgemaid efekte HaCat rakuliini rakud. Kuna tegemist on immortaliseeritud püsiliiniga, siis on asjakohasemate tulemuste saamiseks hea võrdluseks kasutada lisaks ka HPEK ning teisi primaarseid rakuliine.

KOKKUVÕTE

Antud magistritöö põhieesmärgiks oli paika panna tingimused KEAP1-NRF2 oksüdatiivse stressi vastusraja aktiveerimiseks koekultuuri rakkudes. Selle tarbeks testiti erinevaid rakuliine, oksüdatiivse stressi indutseerijaid, kontsentratsioone ja inkubatsiooniaegu. Peamine rõhk asetati endogeenseid ROS-e hästi mimikeeriva vesinikperoksiidi (H_2O_2) ja laialdaselt kasutatavate ksenobiootiliste mõjurite *tert*-butüülhüdrokinooni (tBHQ) ja dietüülmaelaadi (DEM) võrdlusele. Seda nii NRF2-e aktivatsiooni ajalise dünaamika, aktiveerunud NRF2-e lokaliseerimise muutuse kui ka DNA kahjustuste vastaste kaitseradade ATM-CHK2 ja ATR-CHK1 aktiveerimise võtmes.

Käesoleva töö tulemustest selgus, et H_2O_2 -e ja ksenobiootiliste mõjurite tBHQ ja DEM-i efekt KEAP1-NRF2 rajale on üsna erinev. H_2O_2 -e efekt KEAP1-NRF2 raja aktiveerimisele on kiire ja kaduv. Osalt on see ilmselt seotud sellega, et H_2O_2 on üsna ebastabiilne aine ning selle neutraliseerimine toimub rakus kiirelt. tBHQ ja DEM-i neutraliseerimine nii kiiresti aga ei käi ning KEAP1-NRF2 raja aktivatsioon nende ühenditega on tunduvalt aeglasem ja püsib ka pärast induktori eemaldamist. Kuna H_2O_2 ning ksenobiootikumid tBHQ ja DEM kuuluvad erinevatesse KEAP1 aktivatsiooniklassidesse (Saito *et al.*, 2015) ning kummagi efekt KEAP1-NRF2 raja aktiveerimisele erines, siis võib eeldada, et ka mõjurite jaotus erinevatesse KEAP1 induktorite klassidesse võib omada rolli stressivastuse kujundamisel. Ka KEAP1-NRF2 ja CHK1/CHK2 vastusradu võrreldes ilmsid erinevused nende dünaamikas. Tundub, et esimene rada on kahjustusi ennetav ja kiiremini reageeriv ning teine pigem genoomsete kahjustuste tagajärgedega võitlev ja hilisemas staadiumis aktiveeruv.

Käesoleva töö tulemuste alusel sobiks meie uurimisrühmas KEAP1-NRF2 vastusraja aktiveerimiseks kõige paremini tBHQ või DEM, kuna antud mõjurite võime NRF2-te aktiveerida on pikemaajalisem ja püsivam. H_2O_2 -te võiks induktorina kasutada vaid madalates kontsentratsioonides ja lühiajalise inkubatsiooniaja vältel. Kõige sobivamaks testitud rakuliiniks KEAP1-NRF2 raja uurimiseks osutus keratinotsüütide püsirakuliin HaCat.

Comparative analysis of inducers activating the oxidative stress pathway of KEAP1-NRF2

Mai-Brit Tänäva

Summary

Cells of all organisms are constantly exposed to insults of oxidative stress from endogenous and exogenous origins. Cells have adapted to such attacks with different protection mechanisms. One of them is the KEAP1-NRF2 signal pathway that recognizes a wide variety of endogenous and xenobiotic stressors and protects the cell from oxidative damage by triggering the expression of many detoxifying and antioxidative genes (Itoh *et al.*, 1999). Under unstressed conditions, redox-sensitive KEAP1 keeps NRF2 in the cytoplasm and continuously sends each newly synthesized NRF2 protein to a degradation pathway (Itoh *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2004). Under conditions of oxidative stress, KEAP1 is modified through its sensitive cysteine residues and no longer interacts with *de novo* synthesized NRF2 proteins (Itoh *et al.*, 1999; Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Wakabayashi *et al.*, 2004). Thus, NRF2 escapes the degradation pathway and instead travels to the nucleus where it binds to the antioxidant response element (ARE) and initiates the transcription of different protective genes (Itoh *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2005).

A large number of different chemical agents, that induce intracellular stress and the accumulation of reactive oxygen species (ROS), have been used in order to activate KEAP1-NRF2 pathway under *in vitro* conditions. For the most part, various xenobiotic compounds such as tBHQ and DEM (Watai *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Takaya *et al.*, 2012), but such agents, however, can't accurately mimic intracellular stress. The use of H₂O₂, on the other hand, mimics endogenous accumulation of ROS fairly well (Chance *et al.*, 1979), but its use as a KEAP1-NRF2 pathway activator has been controversial and scarce. Based on this knowledge, the effect of H₂O₂, tBHQ and DEM on the activation of NRF2 was compared. The aim was to set up optimal conditions for future KEAP1-NRF2 pathway activation experiments.

The results of this study revealed that H₂O₂, tBHQ and DEM activate KEAP1-NRF2 pathway in a distinctly different manner. Incubation with H₂O₂ induces a rapid and short-lived activation of NRF2 while the activation with tBHQ and DEM is much slower, long-lived and

more stable. This activation pattern difference is likely, in part, due to the fact that H₂O₂ is neutralized in the cells rather quickly (Gülden *et al.*, 2010), while tBHQ and DEM in a much slower manner. On the other hand, H₂O₂, tBHQ and DEM belong to different classes of KEAP1 inducers (Saito *et al.*, 2015). This is based on which cysteine residues are necessary for the detection of each stressor (Saito *et al.*, 2015). Presumably, this as well plays a role in the difference of activation patterns of NRF2 by the aforementioned inducers. Differences in the dynamics of KEAP1-NRF2 and CHK1 / CHK2 were also observed. The first pathway seems to be activated in earlier stages of stress and as a preventive measure, the second one in later stages in order to fight the consequences of genomic damage.

Based on these results, the best suited oxidative stress inducers for the activation of KEAP1-NRF2 pathway in our research group would be tBHQ and DEM as their effect on NRF2 activation is long-lived and more stable. H₂O₂ suits only in lower concentrations and shorter incubation periods. Based on the cell line comparison, the most suitable cell line for future studies on KEAP1-NRF2 pathway would be the immortalized human keratinocyte cell line HaCat.

KIRJANDUSE LOETELU

- Ahn, J.Y., Schwarz, J.K., Piwnica-Worms, H. & Canman, C.E. (2000). Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res.* 60:5934–6.
- Asamura, H., Tsuta, K., Kokubu, A., Yamamoto, M., Shibata, T., Odogawa, R., Hirohashi, S., Ohta, T. & Tong, K.I. (2008). Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:13568–73.
- Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 421:499–506.
- Barzilai, A., Rotman, G. & Shiloh, Y. (2002). ATM deficiency and oxidative stress: A new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 22:3–25.
- Bedard, K. & Krause, K.-H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87:245–313.
- Berquist, B.R. & Wilson, D.M. (2012). Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. *Cancer Lett.* 327:61–72.
- Blackford, A.N. & Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell.* 66:801–817.
- Buckley, B.J., Li, S. & Whorton, A.R. (2008). Keap1 modification and nuclear accumulation in response to S-nitrosocysteine. *Free Radic. Biol. Med.* 44:692–8.
- Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M.C., Walter, J.C. & Cimprich, K.A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev.* 19:1040–52.
- Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors.* 6:391–7.
- Canning, P., Sorrell, F.J. & Bullock, A.N. (2015). Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radic. Biol. Med.* 88:101–7.
- Chowdhry, S., Zhang, Y., McMahon, M., Sutherland, C., Cuadrado, A. & Hayes, J.D. (2013). Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene.* 32:3765–81.

- Ciccia, A. & Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell.* 40:179–204.
- Cuadrado, A., Hayes, J.D., McMahon, M., Chowdhry, S., Rada, P. & Rojo, A.I. (2011). SCF/TrCP Promotes Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent Degradation of the Nrf2 Transcription Factor in a Keap1-Independent Manner. *Mol. Cell. Biol.* 24:8477–86.
- Cullinan, S.B., Gordan, J.D., Jin, J., Harper, J.W. & Diehl, J.A. (2004). The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol. Cell. Biol.* 24:8477–86.
- Davies, K.J.A. (1999). The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: A new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life.* 48:41–7.
- Deshmukh, P., Unni, S., Krishnappa, G. & Padmanabhan, B. (2017). The Keap1–Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases. *Biophys. Rev.* 9:41–56.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. & Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:11908–13.
- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82:47–95.
- Eggler, A.L., Small, E., Hannink, M. & Mesecar, A.D. (2009). Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1. *Biochem. J.* 422:171–180.
- Eskandani, M., Hamishehkar, H. & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. (2014). Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chem.* 153:315–20.
- Falck, J., Coates, J. & Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature.* 434:605–11.
- Forman, H.J., Torres, M. & Fukuto, J. (2002). Redox signaling. *Mol. Cell. Biochem.* 234–235:49–62.

- Fourquet, S., Biard, D. & Toledano, M.B. (2010). Activation of NRF2 by Nitrosative Agents and H₂O₂ Involves. *J Biol Chem.* 285:8463–71.
- Fujii, S., Sawa, T., Ihara, H., Tong, K.I., Ida, T., Okamoto, T., Ahtesham, A.K., Ishima, Y., Motohashi, H., Yamamoto, M. & Akaike, T. (2010). The critical role of nitric oxide signaling, via protein S-guanylation and nitrated cyclic GMP, in the antioxidant adaptive response. *J. Biol. Chem.* 285:23970–84.
- Gharavi, N., Haggarty, S. & El-Kadi, A.O.S. (2007). Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. *Curr. Drug Metab.* 8:1–7.
- Giglia-Mari, G., Zotter, A. & Vermeulen, W. (2011). DNA damage response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:1–19.
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S.X. & Dunphy, W.G. (2000). Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev.* 14:2745–56.
- Hast, B.E., Goldfarb, D., Mulvaney, K.M., Hast, M.A., Siesser, P.F., Yan, F., Hayes, D.N. & Major, M.B. (2013). Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination. *Cancer Res.* 73:2199–210.
- Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S. & Floyd, R.A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1456–62.
- Hirao, A., Cheung, A., Duncan, G., Girard, P., Elia, A.J., Wakeham, A., Okada, H., Sarkissian, T., Wong, J.A., Sakai, T., Stanchina, E. De, Bristow, R.G., Suda, T., Lowe, S.W., Jeggo, P.A. et al. (2002). Chk2 Is a Tumor Suppressor That Regulates Apoptosis in both an Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)-Dependent and an ATM-Independent Manner. *Mol. Cell. Biol.* 22:6521–32.
- Hourihan, J.M., Kenna, J.G. & Hayes, J.D. (2012). The Gasotransmitter Hydrogen Sulfide Induces Nrf2-Target Genes by Inactivating the Keap1 Ubiquitin Ligase Substrate Adaptor Through Formation of a Disulfide Bond Between Cys-226 and Cys-613. *Antioxid. Redox Signal.* 19:465–81.
- Hu, C., Egger, A.L., Mesecar, A.D. & Van Breemen, R.B. (2011). Modification of Keap1 cysteine residues by sulforaphane. *Chem. Res. Toxicol.* 24:515–21.
- Ichinose, M., Naganuma, E., Yamamoto, H., Suda, H., Iso, T., Saito, R., Furusawa, Y.,

- Suzuki, T., Yamamoto, M., Asami, S., Negishi, T., Morita, M. & Hiramoto, K. (2015). Characterizations of Three Major Cysteine Sensors of Keap1 in Stress Response. *Mol. Cell. Biol.* 36:271–84
- Iso, T., Suzuki, T., Baird, L. & Yamamoto, M. (2016). Absolute Amounts and Status of the Nrf2-Keap1-Cul3 Complex within Cells. *Mol. Cell. Biol.* 36:3100–12.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. & Nabeshima, Y. (1997). An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236:313–22.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D. & Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13:76–86.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T. & Yamamoto, M. (2003). Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes to Cells.* 8:379–91.
- Jin, W., Kong, J., Wang, H., Wu, J., Lu, T., Jiang, J., Ni, H. & Liang, W. (2011). Protective effect of tert-butylhydroquinone on cerebral inflammatory response following traumatic brain injury in mice. *Injury.*41:714–18 .
- Kang, M.-I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.-G. & Yamamoto, M. (2004). Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:2046–51.
- Katoh, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A. & Yamamoto, M. (2001). Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes to Cells.* 6:857–68.
- Kim, S.T., Lim, D.S., Canman, C.E. & Kastan, M.B. (1999). Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J. Biol. Chem.* 274:37538–43.
- Kobayashi, A., Kang, M., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K. & Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 24:7130–39.

- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Watai, Y., Tong, K.I., Shibata, T., Uchida, K. & Yamamoto, M. (2006). Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.* 26:221–9.
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Watai, Y., Tong, K.I., Shibata, T., Uchida, K. & Yamamoto, M. (2005). Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.* 26:221–9.
- Kobayashi, M., Li, L., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Kaneko, H., Nakayama, Y., Eguchi, M., Wada, Y., Kumagai, Y. & Yamamoto, M. (2009). The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol. Cell. Biol.* 29:493–502.
- Kovacic, P. & Jacintho, J. (2001). Mechanisms of Carcinogenesis Focus on Oxidative Stress and Electron Transfer. *Curr. Med. Chem.* 8:773–96.
- Kovacic, P., Somanathan, R., Pozos, R., Shangari, N. & O'Brien, P. (2005). Mechanism of Mitochondrial Uncouplers, Inhibitors, and Toxins: Focus on Electron Transfer, Free Radicals, and Structure -Activity Relationships. *Curr. Med. Chem.* 12:2601–23.
- Li, W., Jain, M.R., Chen, C., Yue, X., Hebbar, V., Zhou, R. & Kong, A.N.T. (2005). Nrf2 possesses a redox-insensitive nuclear export signal overlapping with the leucine zipper motif. *J. Biol. Chem.* 280:28430–8.
- Li, Y., Seacat, A., Kuppusamy, P., Zweier, J.L., Yager, J.D. & Trush, M.A. (2002). Copper redox-dependent activation of 2-tert-butyl(1,4)hydroquinone: formation of reactive oxygen species and induction of oxidative DNA damage in isolated DNA and cultured rat hepatocytes. 518:1–11.
- Li, W., Yu, S., Liu, T., Kim, J.H., Blank, V., Li, H. & Kong, A.N.T. (2008). Heterodimerization with small Maf proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESzip motif. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1783:1847–56.
- Li, J. & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 48:6194–206.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L.A. & Elledge, S.J. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* 14:1448–59.

- Marcucci, G., Bloomfield, C.D., Caligiuri, M.A., Tachibana, K.E., Laskey, R.A., Coleman, N., Sil, A., Morgan, D., Johnson, A., Toczyski, D., Blackburn, E., Tlsty, T., Haber, J., Elledge, S., Committee, A. et al. (2010). ATM Activation by Oxidative Stress. *Science*. 330:517–21.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S.P. & Elledge, S.J. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 316:1160–66
- Matsuoka, S., Huang, M. & Elledge, S.J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*. 282:1893–97.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K. & Elledge, S.J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:10389–94.
- McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J.D. (2004). Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J. Biol. Chem.* 279:31556–67.
- Motohashi, H., Katsuoka, F., Engel, J.D. & Yamamoto, M. (2004). Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:6379–84.
- Nioi, P., Nguyen, T., Sherratt, P.J. & Pickett, C.B. (2005). The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 25:10895–906.
- Ogura, T., Tong, K.I., Mio, K., Maruyama, Y., Kurokawa, H., Sato, C. & Yamamoto, M. (2010). Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:2842–7.
- Ozeri-Galai, E., Schwartz, M., Rahat, A. & Kerem, B. (2008). Interplay between ATM and ATR in the regulation of common fragile site stability. *Oncogene*. 27:2109–17.
- Padmanabhan, B., Nakamura, Y. & Yokoyama, S. (2008). Structural analysis of the complex of Keap1 with a prothymosin alpha peptide. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64:233–8.

- Raderschall, E., Golub, E.I. & Haaf, T. (2002). Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:1921–6.
- Sahni, S.K., Rydkina, E. & Sahni, A. (2008). The proteasome inhibitor MG132 induces nuclear translocation of erythroid transcription factor Nrf2 and cyclooxygenase-2 expression in human vascular endothelial cells. *Thromb. Res.* 122:820–5.
- Saito, R., Suzuki, T., Hiramoto, K., Asami, S., Naganuma, E., Suda, H., Iso, T., Yamamoto, H., Morita, M., Baird, L., Furusawa, Y., Negishi, T., Ichinose, M. & Yamamoto, M. (2015). Characterizations of Three Major Cysteine Sensors of Keap1 in Stress Response. *Mol. Cell. Biol.* 36:271–84.
- Schilderman, P.A., Rhijnsburger, E., Zwingmann, I. & Kleinjans, J.C. (1995). Induction of oxidative DNA damages and enhancement of cell proliferation in human lymphocytes in vitro by butylated hydroxyanisole. *Carcinogenesis.* 16:507–12.
- Sheftel, V.O. (2000). *Indirect Food Additives and Polymers: Migration and Toxicology*, p. 313, 950. Crc Press, Boca Raton.
- Shiloh, Y. & Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14:197–210.
- Smith, J., Mun Tho, L., Xu, N. & A. Gillespie, D. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res.* 108:73–112
- Sun, Z., Wu, T., Zhao, F., Lau, A., Birch, C.M. & Zhang, D.D. (2011). KPNA6 (Importin 7)-Mediated Nuclear Import of Keap1 Represses the Nrf2-Dependent Antioxidant Response. *Mol. Cell. Biol.* 31:1800–11.
- Takaya, K., Suzuki, T., Motohashi, H., Onodera, K., Satomi, S., Kensler, T.W. & Yamamoto, M. (2012). Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic. Biol. Med.* 53:817–27.
- Tamberg, N., Tahk, S., Koit, S., Kristjuhan, K., Kasvandik, S., Kristjuhan, A. & Ilves, I. (2018). Keap1–MCM3 interaction is a potential coordinator of molecular machineries of antioxidant response and genomic DNA replication in metazoa. *Sci. Rep.* 8:12136.
- Tamir, T.Y., Mulvaney, K.M. & Major, M. Ben (2017). Dissecting the Keap1/Nrf2 pathway through proteomics. *Curr. Opin. Toxicol.* 2:118–124.

- Theodore, M., Kawai, Y., Yang, J., Kleshchenko, Y., Reddy, S.P., Villalta, F. & Arinze, I.J. (2008). Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* 283:8984–94.
- Thimmulappa, R.K., Mai, K.H., Srisuma, S., Kensler, T.W., Yamamoto, M. & Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* 62: 5196–203.
- Tong, K.I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T. & Yamamoto, M. (2006). Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol. Cell. Biol.* 26:2887–900.
- Tong, K.I., Kobayashi, A., Katsuoka, F. & Yamamoto, M. (2006). Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: A hinge and latch mechanism, *Biol. Chem.* 387:1311–20
- Tong, K.I., Padmanabhan, B., Kobayashi, A., Shang, C., Hirotsu, Y., Yokoyama, S. & Yamamoto, M. (2007). Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol. Cell. Biol.* 27:7511–21.
- Tsai, F.-L., Vijayraghavan, S., Prinz, J., MacAlpine, H.K., MacAlpine, D.M. & Schwacha, A. (2015). Mcm2-7 Is an Active Player in the DNA Replication Checkpoint Signaling Cascade via Proposed Modulation of Its DNA Gate. *Mol. Cell. Biol.* 35:2131–43.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39:44–84.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160:1–40.
- Wada, Y., Nakayama, Y., Li, L., Kobayashi, M., Nakajima-Takagi, Y., Iwamoto, N., Yamamoto, M., Kumagai, Y., Eguchi, M. & Kaneko, H. (2008). The Antioxidant Defense System Keap1-Nrf2 Comprises a Multiple Sensing Mechanism for Responding to a Wide Range of Chemical Compounds. *Mol. Cell. Biol.* 29:493–502.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W. & Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:2040–5.

- Wakabayashi, J., Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Maher, J., Motohashi, H. & Yamamoto, M. (2008). Physiological Significance of Reactive Cysteine Residues of Keap1 in Determining Nrf2 Activity. *Mol. Cell. Biol.* 28:2758–70.
- Walton, P.A. & Pizzitelli, M. (2012). Effects of peroxisomal catalase inhibition on mitochondrial function. *Front. Physiol.* 3:108.
- Wang, X.J., Hayes, J.D., Higgins, L.G., Wolf, C.R. & Dinkova-Kostova, A.T. (2010). Activation of the NRF2 Signaling Pathway by Copper-Mediated Redox Cycling of Para- and Ortho-Hydroquinones. *Chem. Biol.* 17:75–85.
- Watai, Y., Kobayashi, A., Nagase, H., Mizukami, M., Mcevoy, J., Singer, J.D., Itoh, K. & Yamamoto, M. (2007). Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1. *Genes to Cells.* 12:1163–78.
- Weber, C.A., Duncan, C.A., Lyons, M.J. & Jenkinson, S.G. (1990). Depletion of tissue glutathione with diethyl maleate enhances hyperbaric oxygen toxicity. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 258:L308–L312.
- Wu, T., Zhao, F., Gao, B., Tan, C., Yagishita, N., Nakajima, T., Wong, P.K., Chapman, E., Fang, D. & Zhang, D.D. (2014). Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis. *Genes Dev.* 28:708–22.
- Yamamoto, M., Katsuoka, F., Engel, J.D., Motohashi, H., Ishii, T. & Aburatani, H. (2005). Genetic Evidence that Small Maf Proteins Are Essential for the Activation of Antioxidant Response Element-Dependent Genes. *Mol. Cell. Biol.* 25:8044–51.
- Zhang, D.D. & Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 23:8137–51.
- Zhang, D.D., Lo, S.-C., Cross, J. V, Templeton, D.J. & Hannink, M. (2004). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell. Biol.* 24:10941–53.
- Zou, L. & Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science.* 300:1542–48

TÄNUSÕNAD

Täna oma juhendajaid Ivar Ilvest ja Nele Tambergi oskusliku juhendamise eest, teie abi ja väärt nõuanded olid antud magistr töö valmimise aluseks. Suured tänud ka teistele meie uurimisgrupi liikmetele toetava ja sooja õhkkonna loomisel.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mai-Brit Tänava,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „KEAP1-NRF2 oksüdatiivse stressi vastusrada aktiveerivate induktorite võrdlev analüüs“, mille juhendaja on Ivar Ilves ja Nele Tamberg, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Mai-Brit Tänava

28.05.2019