

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Kinázové dráhy v regulaci apoptózy  
Bakalářská práce

2020

Zuzana Beránková

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Kinase pathways in regulation of apoptosis  
Bachelor thesis

2020

Zuzana Beránková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zuzana Beránková**  
Osobní číslo: **C15190**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Název tématu: **Kinázové dráhy v regulaci apoptózy**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis kinázových drah v regulaci apoptózy. V kompilační práci se nejprve zaměřte na obecný popis apoptózy, dále pak na popis aktivačních cest apoptózy. Následně uveďte přehled vybraných kinázových drah, které se účastní přímé regulace apoptózy. V závěru práce popište patologie vybraných kinázových drah.
- 2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. ScienceDirect, HighWire, NCBI Pubmed, apod.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce**

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Jiří Handl**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce:

**Mgr. Jan Čapek**

Katedra biologických a biochemických věd

Ostatní konzultanti:

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne 13.7. 2020

Zuzana Beránková

### Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména Mgr. Janu Čapkovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu při konzultacích a trpělivost při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Jiřímu Handlovi za vedení této práce. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině za jejich podporu po celou dobu studia.

## **ANOTACE**

Správná funkce signálních drah je kritická pro správnou funkci organismu. Důležitou roli v jejich regulaci zastávají eukaryotické protein kinázy. Cílem této práce je seznámit čtenáře s aktuálními poznatky v oblasti buněčné smrti, funkcí kináz při apoptóze a s patologií vybraných kinázových drah. V první části je rozpracováno nejnovější členění jednotlivých typů buněčné smrti podle doporučení NCCD z roku 2018. Druhá část je zaměřena na fungování MAPK kináz a jejich patologické stavy spojené s buněčnou smrtí.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

regulovaná buněčná smrt, RCD, apoptóza, kinázy, MAPK, p38, ERK, JNK

## **TITLE**

Kinase pathways in regulation of apoptosis

## **ANNOTATION**

The proper function of signalling pathways is critical to the proper function of the organism. Eukaryotic protein kinases play an important role in their regulation. This work aims to acquaint the reader with current knowledge in the field of cell death, the function of kinases in apoptosis, and the pathology of selected kinase pathways. The first part elaborates on the latest classification of individual types of cell death according to the NCCD recommendations of 2018. The second part focuses on the functioning of MAPK kinases and their pathological conditions associated with cell death.

## **KEYWORDS**

regulated cell death, RCD, apoptosis, kinases, MAPK, p38, ERK, JNK

# OBSAH

ÚVOD .....	- 13 -
1 BUNĚČNÁ SMRT.....	- 14 -
1.1 Historie.....	- 14 -
1.2 Dělení buněčné smrti.....	- 15 -
1.2.2 ACD – Náhodná buněčná smrt.....	- 15 -
1.2.3 RCD – Regulovaná buněčná smrt .....	- 16 -
2 VYBRANÉ TYPY RCD.....	- 18 -
2.1 Apoptóza .....	- 18 -
2.1.1 Vnitřní cesta apoptózy.....	- 19 -
2.1.2 Vnější cesta apoptózy.....	- 21 -
2.2 Autofágově závislá buněčná smrt .....	- 23 -
2.3 Pyroptóza.....	- 23 -
3 KASPÁZY .....	- 25 -
3.1 Obecný popis.....	- 25 -
3.2 Role kaspáz v apoptóze .....	- 27 -
3.3 Patologie kaspáz.....	- 27 -
4 KINÁZY.....	- 29 -
4.1 Obecný popis.....	- 29 -
4.2 Dělení kináz.....	- 29 -
4.2.1 Serin/threoninové kinázy.....	- 30 -
4.2.2 Tyrosinové kinázy .....	- 32 -
4.2.3 Atypické kinázy.....	- 33 -
4.3 MAPK kinázy v regulaci apoptózy .....	- 34 -
4.3.1 p38.....	- 35 -
4.3.2 JNK.....	- 37 -
4.3.3 ERK.....	- 38 -
5 ROLE KINÁZ PŘI ONEMOCNĚNÍCH .....	- 40 -
5.1 Alzheimerova choroba .....	- 40 -
5.2 Parkinsonova choroba .....	- 40 -



5.3	Rakovina.....	- 41 -
6	ZÁVĚR.....	- 43 -
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	- 44 -

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

- Akt – protein kináza B
- ACD – náhodná buněčná smrt
- APAF-1 – Faktor aktivující apoptotickou proteázu 1
- Asn-x – Asparagin-AMK sekvence
- ATF – Aktivační transkripční faktor
- ATP – adenosintrifosfát
- Bad – BCL2 asociovaný antagonist buněčné smrti
- Bcl2 – B-buněčný lymfom 2
- Bcl-XL – B-buněčný lymfomextra velký
- Bid – agonista BH3 interagující domény smrti
- CARD – Kaspázová náborová doména
- CASP – kaspáza
- DAMP – molekulární pochody spojené s ohrožením/poškozením
- dATP – deoxyadenosintrifosfát
- DD – doména smrti
- DED – efektorová doména smrti
- DISC – smrt indukující signalizační komplex
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- DR 4/5 – receptor smrti 4/5
- FADD – FAS spojený prostřednictvím domény smrti
- FasL – FAS ligand
- FGFR – fibroblastový receptor růstového faktoru
- IAP – inhibitory apoptózových proteinů
- I $\kappa$ B – inhibitor jaderného faktoru kappa B
- JNK – c-Jun NH<sub>2</sub> terminální kináza
- MAPK – mitogen aktivovaná protein kináza
- MAPKK (MAP2K) – mitogen aktivovaná protein kináza kináza
- MAPKKK (MAP3K) – mitogen aktivovaná protein kináza kináza kináza
- Mcl-1 – Indukovaný protein diferenciac buněk myeloidní leukémie
- MLK – kinázy se smíšeným původem
- NF $\kappa$ B – enhancer aktivovaného nukleového faktoru řetězce B buněk
- PARP1 – Poly [ADP-ribóza] polymeráza 1

PI3K – Fosfoinositid 3-kináza

Puma – p53 upregulovaný modulátor apoptózy

RCD – regulovaná buněčná smrt

RIP – protein inaktivující ribosomy

RIPK – receptor interagující protein kinázu

TNF – nádorový nekrotický faktor

TRADD – Protein domény smrti asociovaný s receptorem faktoru nekrotózy typu 1

TRAIL – Ligand indukující apoptózu související s TNF

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1</b> - Přehled typů buněčné smrti .....	- 12 -
<b>Obrázek 2</b> - Morfologický průběh apoptózy .....	- 18 -
<b>Obrázek 3</b> - Průběh apoptózy vnitřní cestou .....	- 20 -
<b>Obrázek 4</b> - Přehled vnější cesty apoptózy .....	- 22 -
<b>Obrázek 5</b> - Přehled kaspáz účastnících se apoptózy .....	- 25 -
<b>Obrázek 6</b> - Role kaspáz v apoptóze .....	- 27 -
<b>Obrázek 7</b> - Princip funkce kináz .....	- 29 -
<b>Obrázek 8</b> - Souhrn skupiny serin/threoninových kináz .....	- 30 -
<b>Obrázek 9</b> - Aminokyseliny serin, threonin a jeho fosforylovaná forma .....	- 32 -
<b>Obrázek 10</b> - Tyrosin .....	- 33 -
<b>Obrázek 11</b> - Přehled rodiny Mitogen aktivovaných protein kináz .....	- 34 -
<b>Obrázek 12</b> - Legenda k obrázkům 13, 14 a 15 .....	- 36 -
<b>Obrázek 13</b> - Přehled p38 kinázy a jejich upstreamových a downstreamových cest .....	- 36 -
<b>Obrázek 14</b> - JNK kináza a přehled jejich upsteamových a downstreamových cest .....	- 37 -
<b>Obrázek 15</b> - Přehled ERK a jejich upstreamových a downstreamových cest .....	- 39 -
<b>Tabulka I</b> - Přehled členů rodiny BCL .....	- 20 -
<b>Tabulka II</b> - Přehled kaspáz účastnících se apoptózy .....	- 26 -

## ÚVOD

Správný vývoj buněk a životní cyklus mnohobuněčných organismů je úzce spjatý s rovnováhou mezi buněčným životem a smrtí. Buňky jsou neustále vystavovány různým formám a intenzitám stresových podnětů, na které musí reagovat. To vede k opakování otázky „být či nebýt“, respektive jestli je stres příliš velký, než aby buňka mohla dále přežít, nebo se s ním ještě dokáže vyrovnat. Buňky mohou zemřít následkem náhodné buněčné smrti (ACD) nebo biologicky kontrolovaným procesem regulované buněčné smrti (RCD). Zatímco ACD je nekontrolovaným procesem, RCD zahrnuje strukturovanou signální kaskádu s předem definovaným mechanismem.

Apoptóza, jakožto jeden z podtypů RCD, je fyziologický proces vedoucí k zániku buňky. Jedná se o zcela běžný a ve správné míře nutný proces. Apoptóza hraje podstatnou roli v rámci imunitního systému, uplatňuje se jak v prenatálním, tak postnatálním vývoji jedince a podílí se i na udržení buněčné homeostázy.

Rozhodování, zda žít či zemřít, je pro funkčnost organismu velmi důležité a jakákoliv jeho porucha může vést k patologickým stavům. K vyhodnocování slouží buňce několik signálních drah, které reagují na rozdílné formy a velikosti stresových podnětů. Regulace apoptotické buněčné smrti je realizována primárně pomocí kinázových drah. Mezi nejdůležitější kinázy patří například p38 a JNK, které hrají pro-apoptickou roli, nebo ERK, které naopak zajišťují buněčné přežití. Kinázové dráhy jsou velmi složité, úzce vzájemně provázané a iniciované mnoha stimuly, aby se minimalizovala možnost špatného rozhodnutí, a to jak pozitivního – ve smyslu buněčné smrti, tak negativního.

Patologické změny těchto drah, ať již mutací nebo vlivem toxinů, mohou mít za následek vážné důsledky pro organismus, které jsou v některých případech až fatální. Příkladem může být vznik Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, nebo nádorů.

# 1 Buněčná smrt

## 1.1 Historie

Přestože se o buněčnou smrt zajímal již Hippokrates, první podrobný popis zaznamenal až Karl Vogt v polovině 19. století při pozorování umírajících buněk během vývoje ropuch. Rozvoj výzkumu buněčné smrti nastal později. V roce 1972 použili John Kerr, Andrew Wyllie, a Alastair Currie termín apoptóza pro popis programované buněčné smrti, která byla doprovázena morfologickými změnami – těmi se lišila od nekrózy. (Kerr & Wyllie, & Currie, 1972)

Apoptóza a její regulace je základem mnoha fyziologických i patologických procesů, které zahrnují udržení vnitřní homeostázy, remodelaci tkání a onkogenezi (Singh & Letai, & Sarosiek, 2019)

V 80. letech 20. století Wyllie prokázal, že apoptóza je spojena se štěpením DNA působením endonukleáz. Potvrzení genetické kontroly apoptózy vedlo k intenzivnímu studiu buněčné smrti nejen v oblasti cytogenetické, ale i biochemické a morfologické.

Na základě studie vývoje hlísty *Caenorhabditis elegans* v 90. letech minulého století. byly v DNA zkoumaného červa objeveny geny nazvané CED-3, CED-4, a CED-9, které jsou zodpovědné za iniciaci, respektive inhibici apoptózy. Tento druh má geneticky daný počet 1090 somatických buněk. Během vývoje v hermafrodita přesně 131 buněk podstupuje apoptózu, při vývoji v samce je to jen 59. Tento počet buněk podstupujících apoptózu je neměnný. Tyto objevy byly počátkem rozvoje výzkumu molekulárních mechanismů v průběhu apoptózy. (Hengartner & Ellis, & Horvitz, 1992)

Během posledních 30 let probíhá intenzivní výzkum těchto mechanismů u řady organismů včetně člověka. Díky intenzivnímu výzkumu jsou neustále odhalovány nové mechanismy buněčné smrti a dochází k pravidelné aktualizaci dělení buněčné smrti v návaznosti na nové objevy. (Galluzzi et al., 2018)

## 1.2 Dělení buněčné smrti

Fungování mnohobuněčného organismu závisí na vyváženosti mezi buněčným růstem a smrtí. Ty jsou provázané s udržováním integrity tkání, správnou funkcí orgánů a eliminací poškozených nebo dále nepotřebných buněk, to vše za účelem udržení homeostázy organismu.

Starší dělení buněčné smrti byla založena na morfologických a strukturních změnách, ke kterým během buněčné smrti docházelo. První systém klasifikace zahrnoval typy I – apoptóza, II – autofágově dependentní smrt a III. – nekróza. Nekróza byla dlouho považována za neregulovaný proces, což bylo během uplynulých let vyvráceno. (Galluzzi et al., 2007)

Různé klasifikace a nomenklatury dnes způsobují zmatek při rozdělování typů buněčné smrti. Díky intenzivnímu výzkumu a mnoha novým objevům se vyskytla potřeba pravidelně sjednocovat pojmenování nových procesů, drah nebo samotných látek účastnících se podprogramů RCD. Z tohoto důvodu byl zřízen výbor pro nomenklaturu buněčné smrti, který od roku 2005 v návaznosti na nové objevy upravuje klasifikační systém. Bohužel, i přesto se v jednotlivých vědeckých publikacích setkáme s nejednoznačností pojmenování. (Yan & Elbadawi, & Efferth, 2020)

V současné době platí doporučení z roku 2018, které dělí buněčnou smrt na regulovanou (RCD) a náhodnou (ACD). S pokrokem ve výzkumu víme, že jednotlivé buněčné procesy jsou navzájem velmi provázané, často se i svými signálními drahami překrývají. Konečný osud buňky je tak výsledkem souhry mnoha podprogramů buněčné smrti. (Galluzzi et al., 2018)

### 1.2.2 ACD – Náhodná buněčná smrt

Náhodná buněčná smrt je následkem velkého poškození buňky, které přesahuje veškeré kontrolní mechanismy, a buňka tak umírá nezávisle na aktivaci signalizačních drah. Podle některých členění je náhodná buněčná smrt označována jako nekróza. (Proskuryakov & Konoplyannikov, & Gabai, 2003)

K ACD může dojít v důsledku poškození, kdy je narušena integrita buněk, a to především fyzikálními nebo chemickými vlivy (např. působení silných detergentů, změny pH, extrémní teplota). V takovém případě je buňka pasivní oběť, jedná se o energeticky nezávislý a signálně neřízený způsob buněčné smrti. Morfologicky je charakterizována zvětšením objemu buněk, otokem organel, prasknutím cytoplazmatické membrány a ztrátou intracelulárního obsahu bez kondenzace chromatinu. (Galluzzi et al., 2018) Takto usmrcené

buňky uvolňují do okolí svůj obsah včetně cytotoxických látek, jako jsou například molekuly spojené s ohrožením nebo poškozením buňky DAMPs (*danger/damage associated molecular patterns*), které indukují imunitní neinfekční zánětlivou odpověď organismu a mohou vést ke smrti dalších buněk v okolí, které by jinak primární poškození přežily (Krysko et al., 2012).

Z pohledu definice jde o strukturní rozložení buněk vystavených drsným fyzikálně-chemickým podmínkám bez působení specifických molekulárních mechanismů. Právě nemožnost ovlivnit průběh minimalizuje možnosti pro terapeutický výzkum a léčbu. Smrt nekrotických buněk není vždy zcela pasivním procesem, existuje několik forem programované nekrózy – nekroptóza, parthanatos, ferroptóza, pyroptóza a další. Tyto typy buněčné smrti řadíme mezi regulované (Chen & Kang, & Fu, 2018)

### **1.2.3 RCD – Regulovaná buněčná smrt**

K regulované buněčné smrti dochází v rámci cílených fyziologických změn nebo v návaznosti na selhání adaptivní reakce na poruchy extracelulárního nebo intracelulárního prostředí. Zcela fyziologická forma RCD probíhá například při vývoji orgánů a tkání, zatímco patologická forma probíhá důsledkem poruch intracelulárního nebo extracelulárního mikroprostředí, kdy jsou poruchy a působící stres příliš intenzivní pro adaptační reakce buňky. Ta není schopna se vyrovnat se stresem a obnovit buněčnou homeostázu. (Galluzzi & Bravo-San Pedro & Kepp, & Kroemer, 2016)

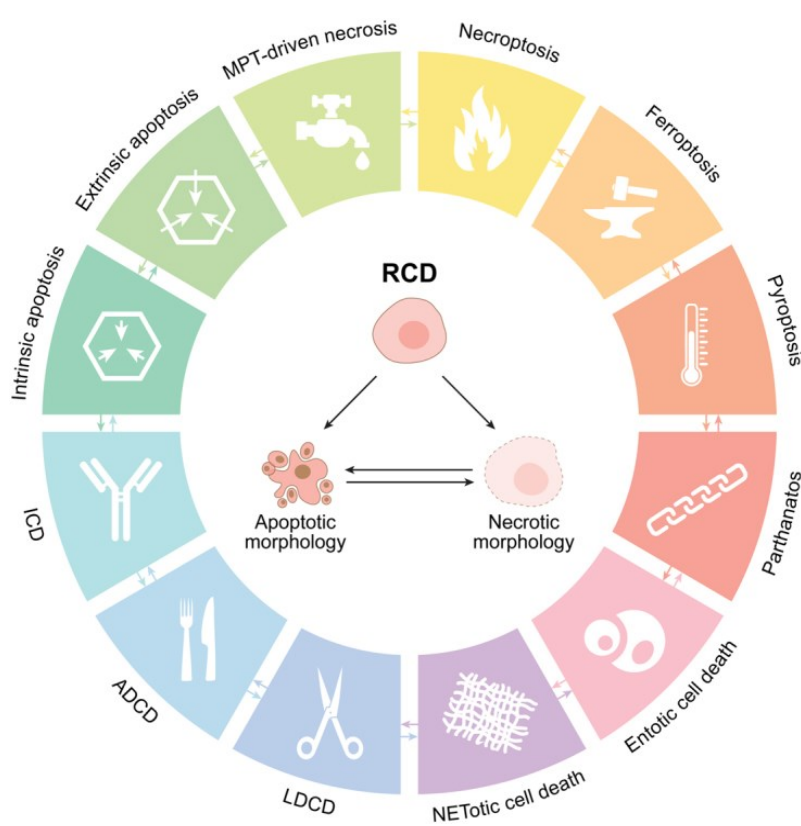
Na rozdíl od náhodné buněčné smrti je velmi regulovaná buněčná smrt přesně řízena sadou signalizačních kaskád, které jsou spouštěny v návaznosti na působící stres nebo přítomnost signálních molekul. Tyto signální dráhy mají přesně definované biochemické, funkční a imunologické dopady na buňku.

Regulovaná buněčná smrt má několik podtypů, které se od sebe liší svou molekulární charakteristikou. Část těchto podtypů se běžně vyskytuje v organismu během vývoje nebo jako součást imunitní odpovědi, část je důsledkem působení specifických toxinů a nesetkáváme se s ní u běžných fyziologických stavů. Mezi základní typy patří apoptotická buněčná smrt, kterou dále dělíme na vnitřní apoptózu, vnější apoptózu a anoikis, a neapoptická buněčná smrt, která zahrnuje autofagii, entózu, paraptózu, mitochondriální buněčnou smrt (mitoptóza a parthanatos), ferroptózu, imunitně reaktivní buněčnou smrt (pyroptóza a NETóza) a mnoho dalších typů, jako je nekroptóza. (Yan & Elbadawi, & Efferth, 2020)



Pro rozlišení, zda buňka umírá regulovaně nebo náhodně, se využívá metoda vnějšího zásahu – pokud jsme schopni farmakoaktivní látkou ovlivnit kaskádu vedoucí k buněčné smrti, jedná se o smrt regulovanou.

Díky své komplexnosti a provázanosti mohou vést alterace molekulárních mechanismů RCD k mnoha poruchám buněčného života (a smrti) a s nimi spojeným patologickým stavům, mezi které patří například Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba nebo rakovina. Na druhou stranu možnost ovlivnit části molekulárního mechanismu RCD farmakologickými nebo genetickými zásahy může přispět k léčbě těchto nemocí a přesné pochopení těchto mechanismů je tak aktivně zkoumaným odvětvím. (Galluzzi et al., 2018)



**Obrázek 1** - Přehled typů buněčné smrti

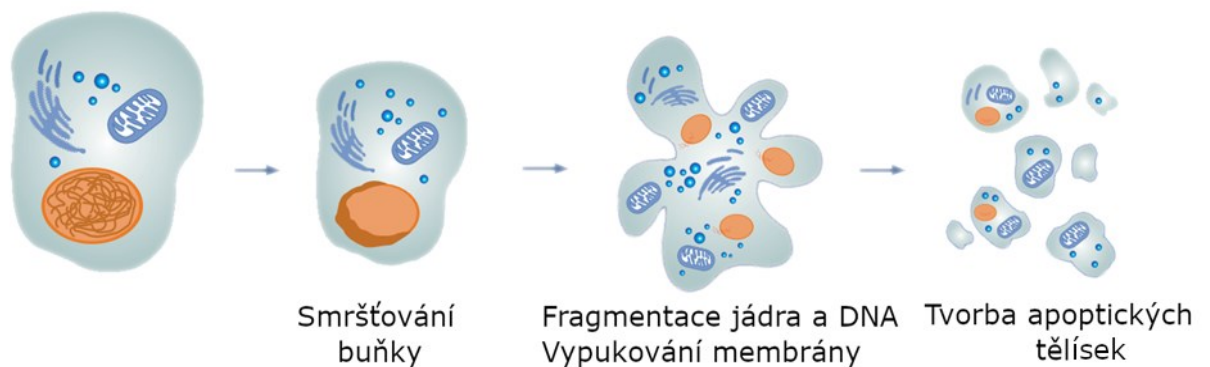
ICD-imunogenní buněčná smrt, ADCD-autofagicky závislá buněčná smrt, LDCD-lysozomálně závislá buněčná smrt, NETotic cell death-smrt netotických buněk, Entotic cell death-buněčná smrt entózou, Parthanatos, Pyroptosis-pyroptóza, Ferroptosis-ferroptóza, Necroptosis-nekroptóza, MTP driven necrosis-nekróza řízená perforací mitochondriální membrány, Extrinsic apoptosis-vnější apoptotická cesta, Intrinsic apoptosis-vnitřní apoptotická cesta, Převzato z: (Galluzzi et al., 2018)

## 2 Vybrané typy RCD

### 2.1 Apoptóza

Apoptóza je proces, který zastavuje buněčný růst a proliferaci a místo toho ústí v kontrolovanou smrt buňky bez vyvolání zánětlivé odpovědi vylitím svého vnitrobuněčného obsahu do okolí. Apoptóza je někdy také nazývána buněčnou sebevraždou, protože k ní dochází za velmi kontrolovaných signálních drah. Tento proces je velmi podobný u všech mnohobuněčných eukaryotických organismů. Z pohledu člověka jde o běžný a neustálý proces, který denně podstoupí až  $10^9$  buněk. (Elmore, 2007)

Apoptóza je kaspázově dependentní buněčná smrt. V momentě, kdy buňka detekuje poškození, iniciační kaspázy jsou aktivovány z jejich neaktivních pro-form. Aktivní iniciační kaspázy dále aktivují efektorové kaspázy, které následně štěpí proteiny a mají za následek fragmentaci DNA aktivací endonukleáz, rozklad jaderných proteinů a cytoskeletu, vystavení ligandů značících buňku pro fagocytózu na povrch buněčné membrány a v neposlední řadě tvorbu apoptotických tělísek. (Martinvalet & Zhu, & Lieberman, 2005) (Poon & Lucas & Rossi, & Ravichandran, 2014)



**Obrázek 2** - Morfologický průběh apoptózy

Převzato a upraveno z: (Apoptosis Handbook, 2016)

Apoptózu můžeme od náhodné buněčné smrti – nekrózy rozlišit pozorovatelnými morfologickými změnami a molekulárními technikami. Mezi morfologické změny patří smršťování buňky, kondenzace chromatinu, fragmentace jádra a extruze v buněčné membráně (angl. blebbing). Ve finální fázi apoptózy dochází k tvorbě apoptotických tělísek. Rozpoznání apoptózy pomocí molekulárních technik zahrnuje detekci jaderných fragmentů, pozitivní přítomnost Annexinu v a další metody. (Majtnerová, & Roušar, 2018)

Podle původu signálu rozlišujeme dva druhy apoptózy, vnitřní cestu iniciovanou v návaznosti na poškození buňky, které sama odhalí pomocí vnitrobuněčných senzorů, nebo vnější cestu, ke které dochází v důsledku interakce mezi buňkami imunitního systému a poškozenou buňkou. Na závěr dochází k rychlému odstranění apoptotických tělísek makrofágy nebo jinými buňkami s fagocytární aktivitou procesem zvaným efferocytóza. (Green & Oguin, & Martinez, 2016)

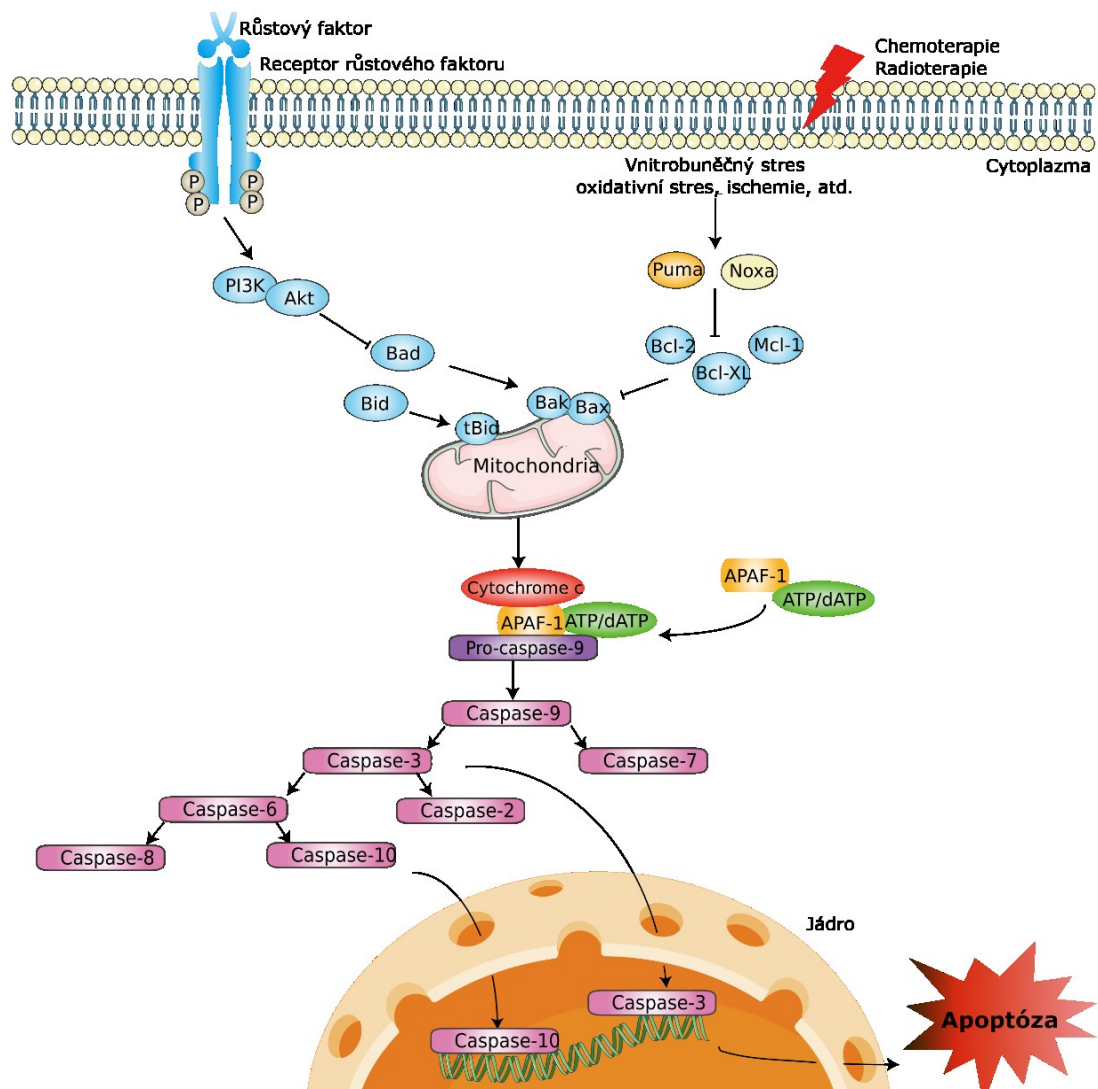
Chyby v regulaci apoptózy, ať už přílišná nebo nedostatečná regulace, mohou vést k patologickým stavům, které mají za následek mnohá onemocnění. (Dickson, 2004)

### **2.1.1 Vnitřní cesta apoptózy**

K tomuto typu buněčné smrti dochází v důsledku vnitrobuněčných i mimobuněčných podnětů, jako je poškození DNA, ischemie a oxidační stres, ale k její iniciaci může dojít i v důsledku chemoterapie nebo radioterapie. (Brenner, & Mak, 2009) Hraje také důležitou funkci ve vývoji a eliminaci poškozených buněk. Vnitřní cesta apoptózy je řízena sadou signálních proteinů a fyzicky spojena s mitochondriemi, proto se velmi snadno aktivuje v reakci na mitochondriální oxidační stres. Průběh signálních drah je ovlivněn členy rodiny Bcl navázanými na mitochondriální membránu, které působí jako pro-apoptotické i anti - apoptotické regulační proteiny.

Bodem zlomu při vnitřní cestě apoptózy je dysfunkce mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu C a aktivaci kaspáz-9 a kaspáz-3. Kaspáza-3 je zodpovědná za typické rysy vnitřní apoptózy jako je fragmentace DNA. (D'Arcy, 2019)

Celistvost mitochondriální membrány je řízena rodinou Bcl-2 proteinů. Tato skupina zahrnuje více než 20 strukturně příbuzných proteinů, které nesou jednu až čtyři homologní domény Bcl-2 (BH). Proteiny Bcl-2 jsou rozděleny do 3 různých podrodin na základě přítomnosti domén BH a jejich schopnosti podporovat nebo inhibovat apoptózu. Permeabilita mitochondriální membrány je ovlivněna členy rodiny Bcl navázanými na mitochondriální membránu, zahrnující jak proapoptotické regulační proteiny Bax, tak anti-apoptotické regulační proteiny Bcl-2. Rovnováha mezi pro-apoptotickými a anti-apoptotickými členy rodiny určuje, zda se buňka zvládne adaptovat na působící stres, nebo podstoupí buněčnou smrt. (R. Green, 2018)



**Obrázek 3 - Průběh apoptózy vnitřní cestou**

PI3K – Fosfoinositid 3-kináza, Akt – protein kináza B, Bad - Bcl2 asociovaný antagonist buněčné smrti, Bid-agonista BH3 interagující domény smrti, Puma - p53 upregulovaný modulátor apoptózy, Bcl2 – B-buněčný lymfom 2, Bcl-XL - B-buněčný lymfom - extra velký, Mcl-1 - Indukovaný protein diferenciace buněk myeloidní leukémie, APAF-1 - Faktor aktivující apoptotickou proteázu 1, ATP – adenosintrifosfát, dATP – deoxyadenosintrifosfát. Převzato a upraveno z: (Loreto, 2014)

**Tabulka I - Přehled členů rodiny Bcl**

Funkce	Doména BH	Proteiny
Pro-apoptotická	multidomény BH	BAK, Bax, Bcl-rambo, Bcl-x <sub>s</sub> , BOK
	BH3	Bad, BID, Bik/Blk, BIM, Bmf, Noxa, PUMA, Hrk/DP5
Proti-apoptotická	multidomény BH	Bcl-2, Bcl-10, BclA1, Bcl-B, Bcl-w, Bcl-x <sub>1</sub> , Mcl-1

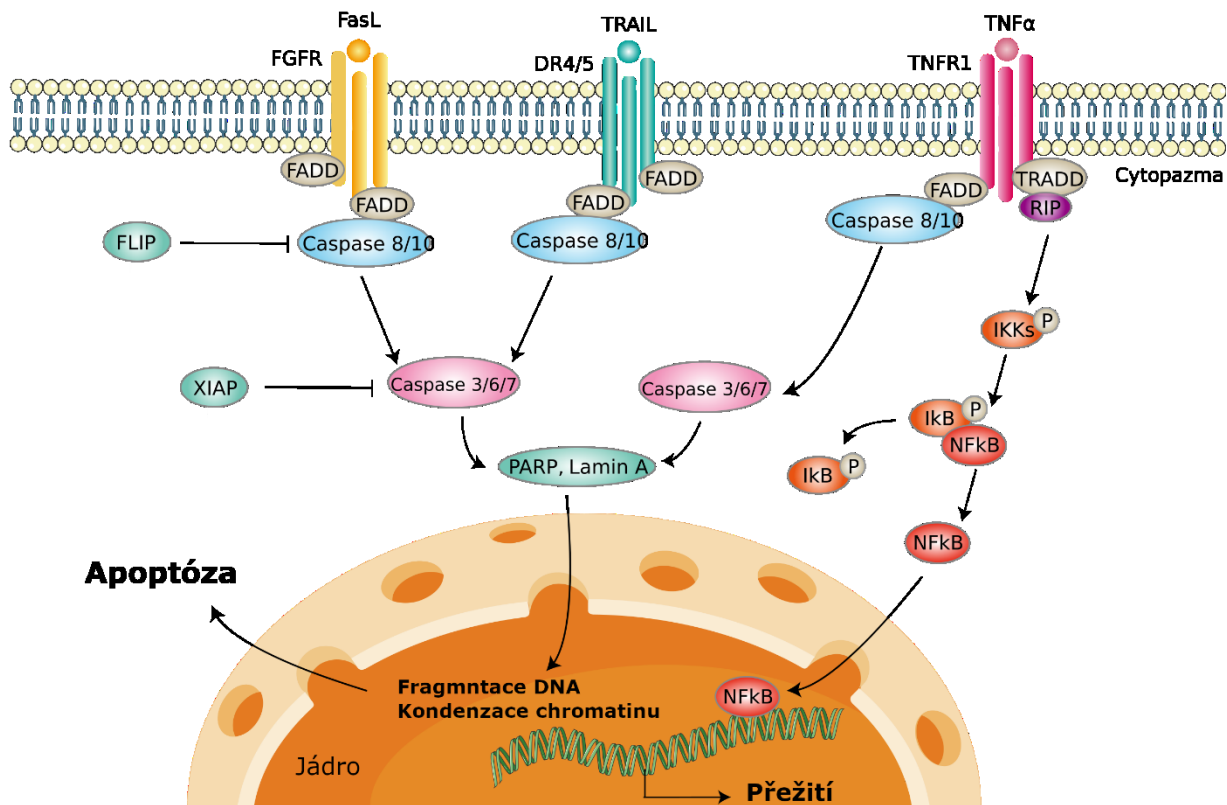
Pro-apoptotické molekuly zvyšují permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, což vede k uvolnění cytochromu C do cytosolu. Ten zde váže faktor Apaf-1 a iniciační prokaspázu-9 za vzniku apoptozomového komplexu. Hydrolyza ATP apoptozomem aktivuje kaspázu 9, a ta následně aktivuje kaspázovou kaskádu. Mitochondrie také uvolňuje do cytosolu proteiny zvané Smac/DIABLO. Ty nepřímo podporují apoptózu blokováním účinků skupiny anti-apoptotických proteinů nazývaných inhibitory apoptózových proteinů (IAP). (Chalah, & Khosravi-Far, 2008)

Většina chemoterapeutických a cílených rakovinových terapií ničí nádorové buňky generováním signalizace smrti, která iniciuje vnitřní apoptotickou cestu programované buněčné smrti. Tento rozvoj apoptózy se liší od extracelulárních signálů, které jsou vytvářeny cytotoxickými buňkami imunitního systému a vyvolávají apoptózu hlavně vnější cestou.

Podle definice NCCD je vnitřní apoptóza proces RCD, ke kterému dochází v důsledku narušení vnitrobuněčného nebo extracelulárního prostředí, a který je charakterizovaný permeabilizací vnější mitochondriální membrány a vykonaný efektorovými kaspázami, hlavně kaspázou 3. (Galluzzi et al., 2018)

### **2.1.2 Vnější cesta apoptózy**

Vnější cesta apoptózy začíná vazbou ligandu na jeden z několika receptorů smrti, které jsou členy nadrodiny TNF – tumor nekrotických faktorů. Navázání ligandu na receptor spouští oligomerizaci receptoru a nábor dalších proteinů obsahujících smrtelné domény (DD), jako jsou TRADD a FADD. Vzniklé komplexy vážou a aktivují pro-kaspázy-8 a -10. Ligandy, které se vážou na membránové receptory jsou například FASL, TNF-a, TRAIL a TWEAK, Tyto ligandy mohou být umístěny v plazmatické membráně okolích buněk nebo se mohou vyskytovat samostatně jako cytokininy vyloučené například makrofágem při objevu poškozené buňky.



**Obrázek 4 - Přehled vnější cesty apoptózy**

zkratky: FasL- FAS ligand, FGFR – fibroblastový receptor růstového faktoru, FADD – FAS spojený prostřednictvím domény smrti, DR 4/5 – receptor smrti 4/5, TRAIL - Ligand indukující apoptózu související s TNF, TNF – nádorový nekrotický faktor, TRADD - Protein domény smrti asociovaný s receptorem faktoru nekrózy typu 1, RIP - protein inaktivující ribozomy, IκB - inhibitor jaderného faktoru kappa B, NFκB - enhancer aktivovaného nukleového faktoru řetězce B buněk. Převzato a upraveno z: (Loreto, 2014)

Jednotlivé signální receptory sdílejí podobné extracelulární domény bohaté na cystein a mají cytoplazmatickou doménu asi 80 aminokyselin nazývanou "smrtebná doména" (DD). Tato smrtebná doména hraje klíčovou roli při přenosu signálu smrti z povrchu buňky do intracelulárních signálních drah.

Trimerizace receptoru má za následek nábor několika domén smrti, a nakonec nábor a aktivaci kaspázy-8 a kaspázy-10. Ty pak buď zahájí apoptózu přímo štěpením, a tím aktivací efektorových kaspáz-3,6 a 7, nebo aktivuje vnitřní apoptotickou cestu štěpením BID k vyvolání účinné buněčné smrti. (Wu & Che & Zheng, & Wu, 2014)

Apoptóza je proces, při kterém buňky podléhají programované smrti a je protiváhou proliferace. Buněčná proliferace spolu s vnitřní a vnější cestou apoptózy jsou úzce spjaty z dobrého důvodu. Pokud buňka nedokáže iniciovat vnitřní cestu apoptózy v důsledku mutace těchto aktivačních mechanismů, dojde k iniciaci vnější cesty apoptózy, nebo alespoň zastavení

množení. Pokud ovšem i tato regulace selže, může buňka růst a dělit se zcela nekontrolovaně, což má za následek rozvoj rakoviny (Bottone & Santin, & Aredia, 2013)

Podle definice NCCD je vnější apoptóza varianta RCD iniciovaná poruchami extracelulárního mikroprostředí detekovanými receptory plazmatické membrány, propagovaná CASP8 a vykonána zejména efektorovou CASP3. (Galluzzi et al., 2018)

## **2.2 Autofágově závislá buněčná smrt**

Autofágově závislá buněčná smrt (ADCD) je podprogram RCD, při kterém dochází k buněčnému zániku v důsledku autofagie. Autofagie je dynamický recyklační proces, který slouží pro odstraňování nefunkčních nebo zbytečných částí buňky. Za normálních okolností podporuje přežití buňky při působení mnoha typů buněčných stresů tím, že odstraňuje poškozené části buňky. V extrémním případě hladovění buňky podporuje autofagie buněčné přežití recyklací buněčných složek, a tím udržováním správné hladiny energie. Tento proces ale může vést až ke smrti buňky, pokud začne autofagie degradovat životně důležité proteiny nebo molekuly související s jinými typy RCD. (Das & Shrivage, & Baehrecke, 2012)

Velmi často dochází k buněčné smrti jiným podprogramem než ADCD. Pokud buňka začne autofagicky odbourávat feritin, což je protein ukládající železo, dojde k uvolnění železa a oxidativnímu poškození, které vede k ferroptóze. Degradace proteinové tyrosinové fosfatázy je jedním z iniciátorů apoptózy. Obecně lze říci, že apoptotické a autofagické mechanismy jsou během vývoje buněčné smrti vysoce propojeny. Autofagie při buněčné smrti neprobíhá jako samostatný proces, ale k zániku buňky vede v kombinaci s ostatními typy RCD. (Denton & Xu, & Kumar, 2015)

Podle definice NCCD je autofágově závislá buněčná smrt podtypem RCD, která je závislá primárně na autofagickém aparátu, nebo jeho složkách. (Galluzzi et al., 2018)

## **2.3 Pyroptóza**

Pyroptóza je vysoce zánětlivá forma RCD, která je spouštěna poruchami extracelulární nebo intracelulární homeostázy při infekci patogeny a je pravděpodobně součástí antimikrobiální a antivirové odpovědi. Také je součástí smrtelného septického šoku. Projevuje se specifickými morfologickými znaky, jako je zvláštní forma kondenzace chromatinu lišící se od apoptotických RCD a buněčné „bobtnání“, které vrcholí permeabilizací plazmatické membrány. K fragmentaci DNA nedochází. Probíhá například při napadení buňky bakterií salmonely nebo u T-pomocných buněk napadených virem HIV. (Jorgensen, & Miao, 2015)

Na molekulární úrovni je pyroptóza závislá na aktivaci jedné nebo více kaspáz, jako jsou CASP1, CASP3, CASP4, CASP5 a CASP11 v závislosti na iniciačním mechanismu.

Pyroptóza řízená CASP1, která patří mezi vrozené imunitní reakce, zamezuje šíření intercelulárních bakterií usmrcením hostitelské buňky a tvorbou tzv. “pore-induced intracellular traps” (PITs), které zadrží stále živé bakterie v membráně mrtvé buňky. Vzniklé pasti mohou být potom stráveny efferocytózou. (Green & Oguin, & Martinez, 2016)

Při chronických patogenních onemocněních zánětlivá odezva neodstraní primární podnět, jak tomu je ve většině případů infekce nebo poranění, a proto následuje chronická forma zánětu, která přispívá k poškození tkáně.

Podle definice NCCD je pyroptóza forma RCD, která kriticky závisí na tvorbě pórů v plazmatické membráně díky působení členů proteinů rodiny gasderminů, často v důsledku zánětlivé aktivace kaspáz. (Galluzzi et al., 2018)

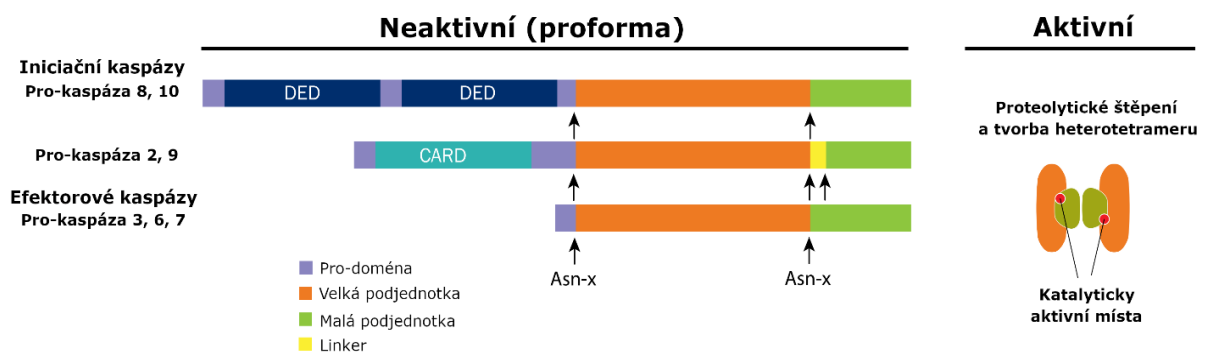


## 3 Kaspázy

### 3.1 Obecný popis

Kaspázy (Cystein ASparagové ProteÁZY) jsou rodinou proteázových enzymů, které hrají zásadní roli při programované buněčné smrti, imunitních reakcích a vývoji. Svůj název dostaly díky jejich funkci cysteinových proteáz. Při aktivaci cystein v jejich aktivním centru atakuje a štěpí cílový protein, dokud je nerozštěpí na aminokyselinové zbytky.

Najdeme je v cytosolu buňky a dělíme je do čtyř skupin podle jejich funkčních vlastností na iniciační kaspázy, zánětlivé kaspázy, efektorové kaspázy a ostatní. Jejich aktivace je zajištěna degradací buněčných částí kontrolovaným způsobem během apoptózy a pyroptózy. Díky tomu se minimalizuje zánětlivý účinek na okolní tkáň. (Shi, 2002)



**Obrázek 5** - Přehled kaspáz účastnících se apoptózy

zkratky: DED – efektorová doména smrti, CARD – Kaspázová náborová doména, Asn - x – Asparagin-AMK sekvence, Převzato a upraveno z: (Apoptosis Handbook, 2016)

Kaspázy se skládají z malé a velké podjednotky a pro-domény. V buňce se vyskytují ve formě prokaspáz – proenzymů neboli zymogenů, které jsou nejprve aktivovány odštěpením pro-domény a jejich následnou dimerizací na svou biologicky aktivní formu, která tvoří heterotetramer složený ze dvou malých a dvou velkých podjednotek. Iniciační kaspázy mají také CARD doménu sloužící pro sjednocování kaspáz do multiproteinových komplexů, nebo efektorovou doménu smrti (DED), která slouží k navázání na aktivační protein a ke společné tvorbě smrt indukujícího signálního komplexu (DISC). (Riley & Malik & Holohan, & Longley, 2015)

K aktivaci efektorových kaspáz slouží například kinázy a aktivované iniciační kaspázy – ty štěpí, a tak aktivují efektorové kaspázy. Tímto způsobem dochází k zesílení a řetězení reakce, což je důležité pro jednoznačnost procesu a jeho rychlost. Finálním výsledkem aktivace kaspáz je degradace buněčných částí na aminokyselinové zbytky, které

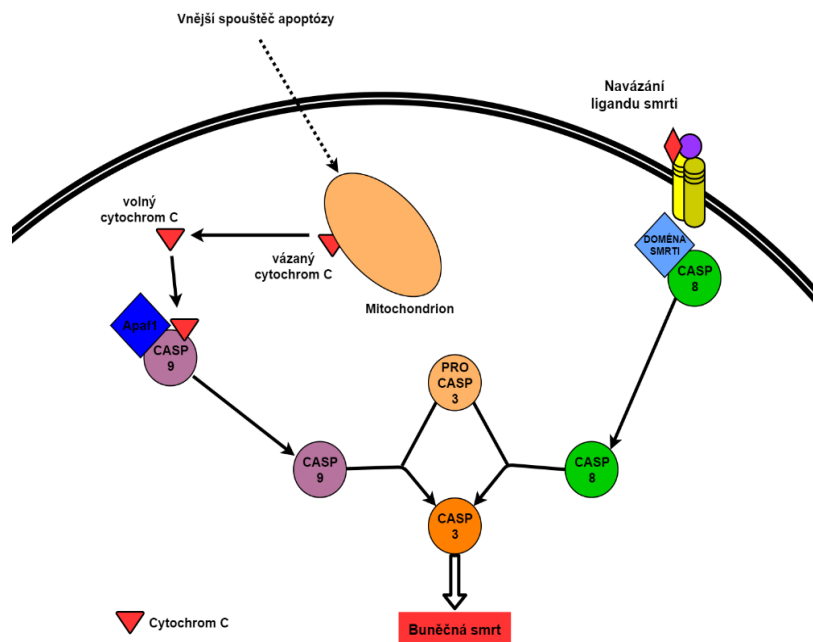
mohou být snadno fagocytovány. Kaspázy ovlivňují také buněčnou proliferaci, diferenciaci a stárnutí. (Shalini & Dorstyn & Dawar, & Kumar, 2015)

**Tabulka II** - Přehled kaspáz účastnících se apoptózy

Typ RCD	Typ kaspázy	Název
<b>Apoptóza</b>	Iniciační	Kaspáza 2
		Kaspáza 8
		Kaspáza 9
		Kaspáza 10
	Efektorová	Kaspáza 3
		Kaspáza 6
		Kaspáza 7
<b>Pyroptóza</b>	Zánětlivá	Kaspáza 1
		Kaspáza 4
		Kaspáza 5
		Kaspáza 11
		Kaspáza 12
		Kaspáza 13

### 3.2 Role kaspáz v apoptóze

Během vnitřní apoptotické cesty se následkem stresu uvolňuje cytochrom C z mitochondrií do cytosolu. Volný cytochrom C se váže na adaptorový protein APAF-1, který následně aktivuje kaspázu 9. Aktivovaná kaspáza 9 štěpí a aktivuje efektorovou kaspázu 3, která následně štěpí buněčné proteiny a způsobuje tím apoptózu. Vnější apoptická cesta je z pohledu kaspáz aktivována extracelulárními ligandy, které se váží na receptory smrti a tvoří společně s ní multiproteinový komplex zvaný DISC. Tento komplex na sebe navazuje prokaspázu 8, čímž ji aktivuje. Ta poté štěpí a aktivuje efektorové kaspázy 3, 6 a 7. (Creagh, 2014) Efektorové kaspázy v buňce degradují téměř 1000 různých proteinů. Část těchto proteinů má důležitou homeostatickou roli a následky jejich degradace se tak velmi rychle projeví na morfologických nebo funkčních změnách. Příkladem je protein PARP-1, sloužící v buňce k opravě DNA, který po štěpení kaspázou tuto svou schopnost ztrácí. (Shi, 2002)



Obrázek 6 - Role kaspáz v apoptóze

zkratky: CASP – kaspáza, pro CASP – prokaspáza, Upraveno dle: (Galluzzi et al., 2018)

### 3.3 Patologie kaspáz

Díky tomu, že jsou kaspázy silně provázené s buněčnou smrtí, účastní se kontroly buněčného cyklu. Pokud v buňce dojde k mutaci, která by mohla vést k neřízené proliferaci a buňka ji během buněčné kontroly objeví, spáchá řízeně apoptotickou smrt. Kaspázy zde hrají roli „katů“, jsou odpovědné za funkční destrukci buňky. Pokud dojde k jejich nefunkčnosti, ať v důsledku mutace genu, chybě signálních drah nebo podobně, apoptotická smrt nemůže

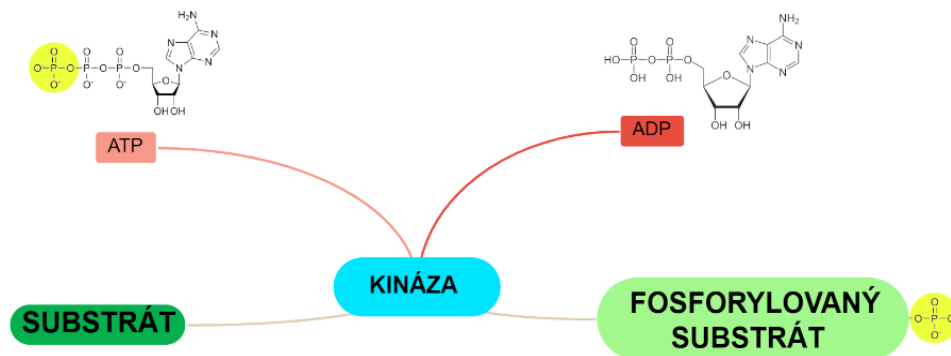
proběhnout a často dochází ke vzniku nádoru. Nedostatečná aktivace kaspáz je také problémem při imunitní odpovědi na napadení organismu, protože nemusí dojít k aktivaci příslušné imunitní odpovědi. (Friedlander, 2003)

V případě hyperaktivace některých kaspáz, jako je CASP3, dochází k opaku a apoptóza probíhá i u jinak zdravých buněk. Toto chování se projevuje u části neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba. Jejich zvýšená aktivita je také spojena s řadou autoimunitních poruch. (Goodsell, 2000)

## 4 Kinázy

### 4.1 Obecný popis

Protein kinázy jsou klíčové regulátory buněčných pochodů. Jde o enzymy, které modifikují substrát adicí fosfátové skupiny procesem zvaným fosforylace. Z chemického hlediska je tak řadíme mezi fosfotransferázy. V buňce katalyzují přenos fosfátové skupiny z vysokoenergetických molekul ATP na specifický substrát – protein, který po fosforylaci mění svou aktivitu. V lidském organismu najdeme přes 500 různých kináz, což z nich dělá jednu z funkčně nejrozmanitějších genových rodin (Manning, 2002). Slouží k regulaci aktivity téměř všech buněčných procesů. Nejvýznamněji se projevují při signální transdukci a koordinaci komplexních dějů, jako je například buněčný cyklus. Díky jejich rozsáhlým účinkům na buňku jsou samy silně regulovány, ať už vlastní fosforylací a defosforylací, aktivačními proteiny nebo inhibičními proteiny. Jednotlivé signální dráhy jsou velmi úzce spjaté a navzájem se ovlivňují. Změny funkčnosti některých kináz vlivem například mutace nebo viru vedou k narušení buněčné regulace, a tím mnoha patologickým stavům. (Roskoski, 2015)



Obrázek 7 - Princip funkce kináz

zkratky: ATP – adenosinetrifosfát, ADP – adenosindifosfát; Upraveno dle: (R. Green, 2018)

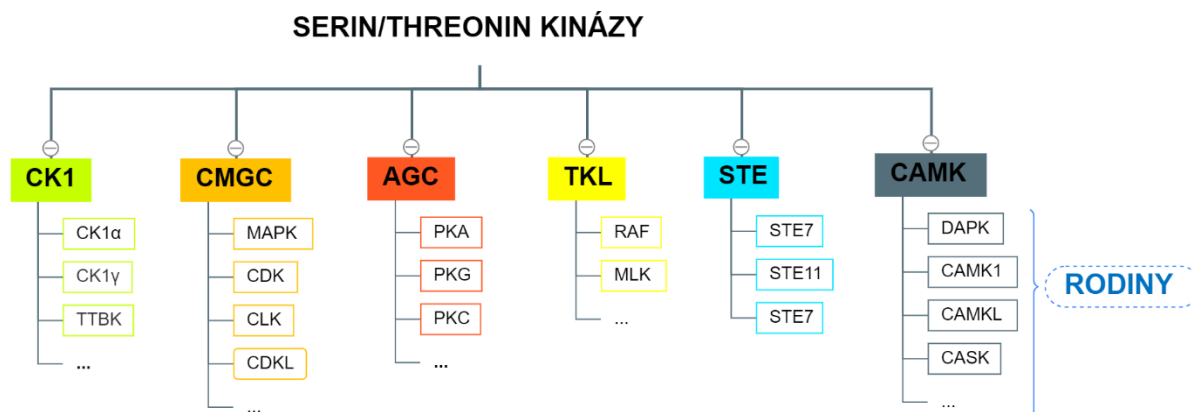
### 4.2 Dělení kináz

Kinázy dělíme podle jejich aminokyselinového složení a charakteristických vlastností na skupiny, rodiny a podrodiny. Dělení odpovídá podobnosti jejich katalytické domény, přičemž se jejich podobnost zvyšuje od skupin k rodinám. V lidském těle rozlišujeme 7 až 10 skupin, které spadají do super rodiny eukaryotických proteinkináz. V rámci skupin kinázy dále dělíme dle jejich cílové substrátové aminokyseliny na serin/threoninové, tyrosinové a atypické kinázy.

## 4.2.1 Serin/threoninové kinázy

Největší skupinou kináz jsou ty fosforylující jak serin, tak i threonin. Tyto aminokyseliny mají identické spojení OH skupiny na postranním řetězci, a proto se při fosforylaci nerozlišují. Fosforylovat lze ale pouze AMK substrátu, které jsou umístěné uvnitř fosfoakceptorového místa, jinak nazývaného jako konsenzuální sekvence – sekvence aminokyselin. Díky způsobu vázání na cílový substrát pomocí hydrofobních sil a iontových vazeb může jedna kináza fosforylovat několik různých proteinů-substrátů, které sdílí podobné konsenzuální centrum. Regulace těchto kináz je nejčastěji zajištěna pomocí pseudosubstrátu, který má stejné konsenzuální centrum jako substrát, ale postrádá aminokyselinu, kterou by kináza fosforylovala. (Cohen, 2004)

Mezi tyto kinázy patří 6 skupin, které rozlišujeme podle jejich katalytických domén



**Obrázek 8** - Souhrn skupiny serin/threoninových kináz

Upraveno dle: (Sakkiah & Cao & Gupta, & Lee, 2017)

### AGC

Tato skupina je pojmenována po rodinách protein kinázách A, G a C (PKA, PKG a PKC). Kinázy této skupiny řadíme nejčastěji mezi intracelulární signalizační kinázy, které jsou modulovány cyklickými nukleotidy, fosfolipidy a vápníkem. Zástupci této rodiny jsou například PKG – protein kináza G, která je součástí signální dráhy oxidu dusného (NO) zapojené do relaxace hladkého svalstva, RSK – ribozomální S6 kináza fosforylující cytoplasmatické ribozomy a tím regulující jejich míru translace. (Lincoln & Dey, & Sellak, 2001)

## CMGC

Tato skupina je pojmenovaná po sadě rodin CDK, MAPK, GSK3 a CLK. Ty mají rozmanité funkce v řízení buněčného cyklu. Příkladem mohou být CDK – cyklin dependentní kinázy, které se účastní dělení, kontroly metabolických pochodů a dalších buněčných dějů. MAPK – mitogen aktivované protein kinázy jsou podrobněji popsány dále. (Varjosalo & Keskitalo & Van Drogen, & Gstaiger, 2013)

## CAMK

Skupina pojmenovaná po  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmmodulin dependentní kinázy (CAMK). K jejich aktivaci dochází v návaznosti na zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů  $\text{Ca}^{2+}$  a kalmmodulinu. Kinázy této skupiny se účastní buněčného cyklu, přeuspořádání buněčného cytoskeletu, udržení homeostázy a jsou také důležitým mediátorem při procesu učení a pamatování. (Brzozowski, & Skelding, 2019)

## CK1

Do počtu menší skupina kináz pojmenovaná po kasein kináze 1. Skupina se sekvenčně velmi liší od ostatních seronin/threoninových kináz. Jejich funkce spočívá v převodu signálů a ovlivňují cirkadiánní rytmy. (Cheong, & Virshup, 2011)

## STE

Tato skupina má tři rodiny kináz (STE20, STE11 a STE7), které se navzájem aktivují a následně aktivují MAPK kinázy. STE7 rodina kináz přímo fosforyluje MAPK a je známá také jako MAPKK nebo MAP2K. STE11 fosforyluje STE7, a je známá jako MAPKKK nebo MAP3K. STE20 je z výše uvedených rodin největší a je označována jako MAP4K. Pouze část STE11 se účastní MAPK kaskád, zbylá část má signální účinky. (Sakkiah & Cao & Gupta, & Lee, 2017)

## TKL

Tato skupina kináz se liší od ostatních serin/threoninových kináz a je sekvencí podobná spíše tyrosinovým kinázám. Funkčně fosforyluje serin/threoninové AMK. Jednotlivé rodiny v rámci skupiny se od sebe velmi liší, a mají proto široké spektrum působení. Mezi rodiny této skupiny řadíme například RAF a MLK – mixed lineage kinases které fungují jako MAP4K,

nebo také RIPK – receptor interagující protein kinázu, která se váže na TNF. (Sakkiah & Cao & Gupta, & Lee, 2017)



**Obrázek 9** - Aminokyseliny serin, threonin a jeho fosforylovaná forma (McMurry, 2012)

#### 4.2.2 Tyrosinové kinázy

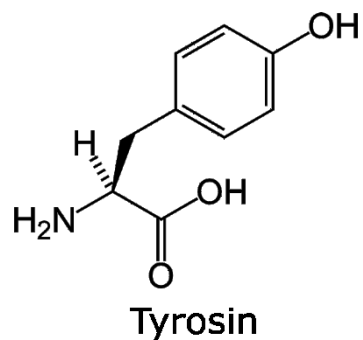
Tyrosinové kinázy dělíme na dvě podskupiny, a to RTK – receptor-dependentní tyrosin kinázy a CTK – cytoplazmatické tyrosin kinázy. V lidském těle najdeme více než 90 různých tyrosinových kináz. Vývojově jsou mladší než serin/threoninové kinázy a nevyskytují se u rostlin ani jednobuněčných organismů.

Většina tyrosinových kináz má komplementární fosfatázu, která ji zbavuje fosfátové skupiny, a tím se deaktivuje. Stejně jakou u serin/threoninových kináz může docházet jejich poškození, čímž se mění jejich aktivita, a tím i funkce v buňce. (Radha & Nambirajan, & Swarup, 1996)

Příkladem rodiny receptor dependentních kináz jsou PVR – receptory růstového faktoru vaskulárního endotelu a destiček. Ty hrají roli v angiogenezi a růstu tkání. Příkladem receptor non-dependentní rodiny je TEC, která zprostředkovává přenos signálů z povrchu buňky do intracelulárních signálních drah.

V dnešní době jsou tyrosinové kinázy zkoumány hlavně pro svou možnost ovlivnění průběhu mnoha nemocí. Funkci těchto kináz ovlivňuje řada bakterií a virů jako Sarkoma virus, papylomavirus a další, které jsou spojeny s vývojem rakoviny. (Schaller et al., 1992) Inhibitory tyrosin kináz se uplatňují například v léčbě pacientů s metastázujícím gastrointestinálním nádorem. (Kris et al., 2003)





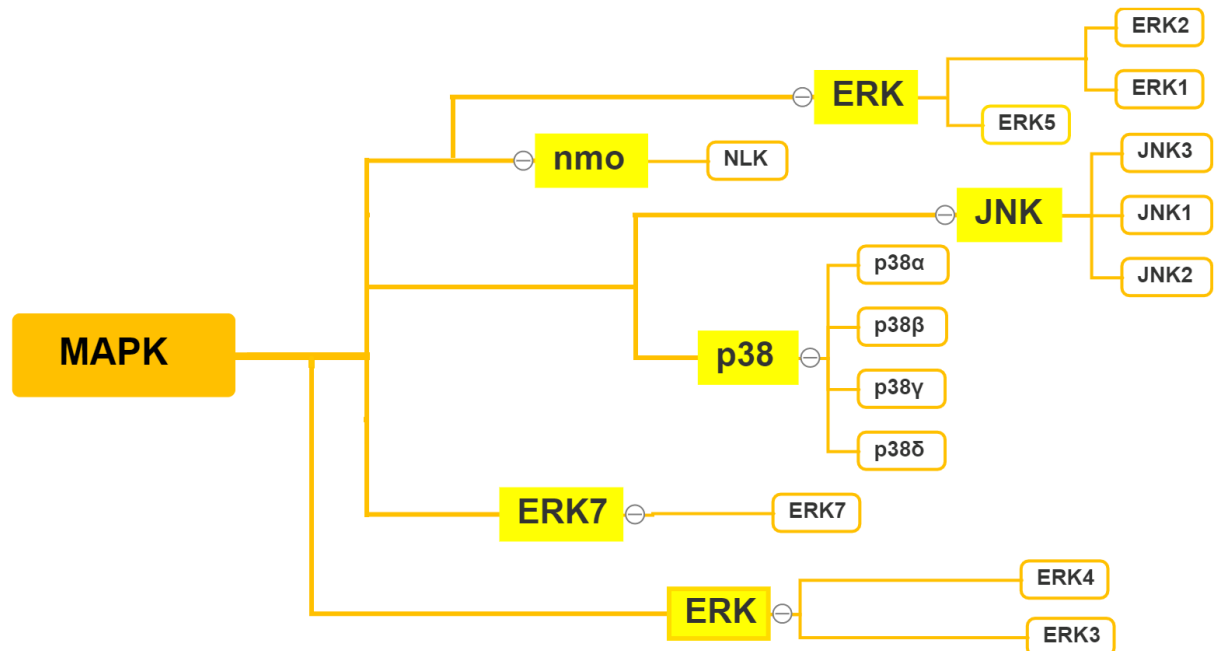
**Obrázek 10** - Tyrosin (McMurry, 2012)

### 4.2.3 Atypické kinázy

Tato skupina zahrnuje jinak nezařazené kinázy, které nejsou sekvenčně podobné výše zmíněným skupinám. Podle některých kategorizací je řadíme zcela mimo super rodinu eukaryotických proteinkináz. Část atypických kináz dokáže fosforylovat všechny tři aminokyseliny, další ale nemají prokázanou žádnou enzymatickou aktivitu. (Bossemeyer, 1995)

### 4.3 MAPK kinázy v regulaci apoptózy

MAPK kinázy spadají do skupiny CMGC serin/threoninových kináz. Podílí se jak na pozitivní, tak na negativní regulaci buněčné smrti.



**Obrázek 11** - Přehled rodiny Mitogen aktivovaných protein kináz

Upraveno dle: (Sakkiah & Cao & Gupta, & Lee, 2017)

Protože většina těchto kináz se v těle účastní regulace stimulované růstovými faktory, jsou tyto kinázy nazývány MAPK – mitogen aktivované protein kinázy. Všechny MAP kinázy mají velmi podobnou strukturu a biochemické vlastnosti. Obecným znakem je jejich aktivace pomocí dvojité fosforylace na tripeptidovém motivu (Thr-X-Tyr) umístěném v aktivační smyčce kinázy (T-smyčka) prostřednictvím tříúrovňové MAPK aktivační kaskády, která zahrnuje MAPK, MAPK kinázu (MAPKK nebo MAP2K) a MAPK kinázu kinázu (MAPKKK nebo MAP3K). Deaktivace MAPK je zprostředkována fosfatázami defosforylací v aktivační smyčce. U savců bylo identifikováno 14 členů MAPK rozdělených do 7 podskupin. Čtyři z nich jsou klasické podskupiny MAPK, které jsou aktivovány tříúrovňovou kaskádou, jako je extracelulárně regulovaná kináza (ERK1/2), C-Jun N-terminální kináza (JNK), p38 MAPK a ERK5, a tři atypické MAPK podskupiny, jako je ERK3/4, ERK7/8 a nemo-like kináza (NLK).

Aktivované MAPK zajišťují fosforylaci a aktivaci proteinových kináz aktivovaných MAPK (MAPKAPK), jako jsou proteiny rodin RSK, MSK nebo MNK a MK2/3/5. (Sakkiah & Cao & Gupta, & Lee, 2017)

Aktivitu MAP kináz ovlivňují dva hlavní faktory, a to signály, které aktivují transmembránové receptory a proteiny s nimi spojené, a pak signály, které inaktivují fosfatázy omezující danou MAP kinázu. Takové signály zahrnují například oxidační stres. (Vlahopoulos, & Zoumpourlis, 2004)

Díky množství rolí, které jednotlivé kinázy v buněčném metabolismu zastávají, je velmi obtížné rozklíčovat jednotlivé děje a přesně určit, co která kináza způsobuje a jaký je mezi nimi vzájemný vztah. Neustále se objevují nové poznatky, které mění nebo upřesňují chování MAPK kináz a pomáhají tak lépe pochopit složitou regulaci buněčných pochodů.

### 4.3.1 p38

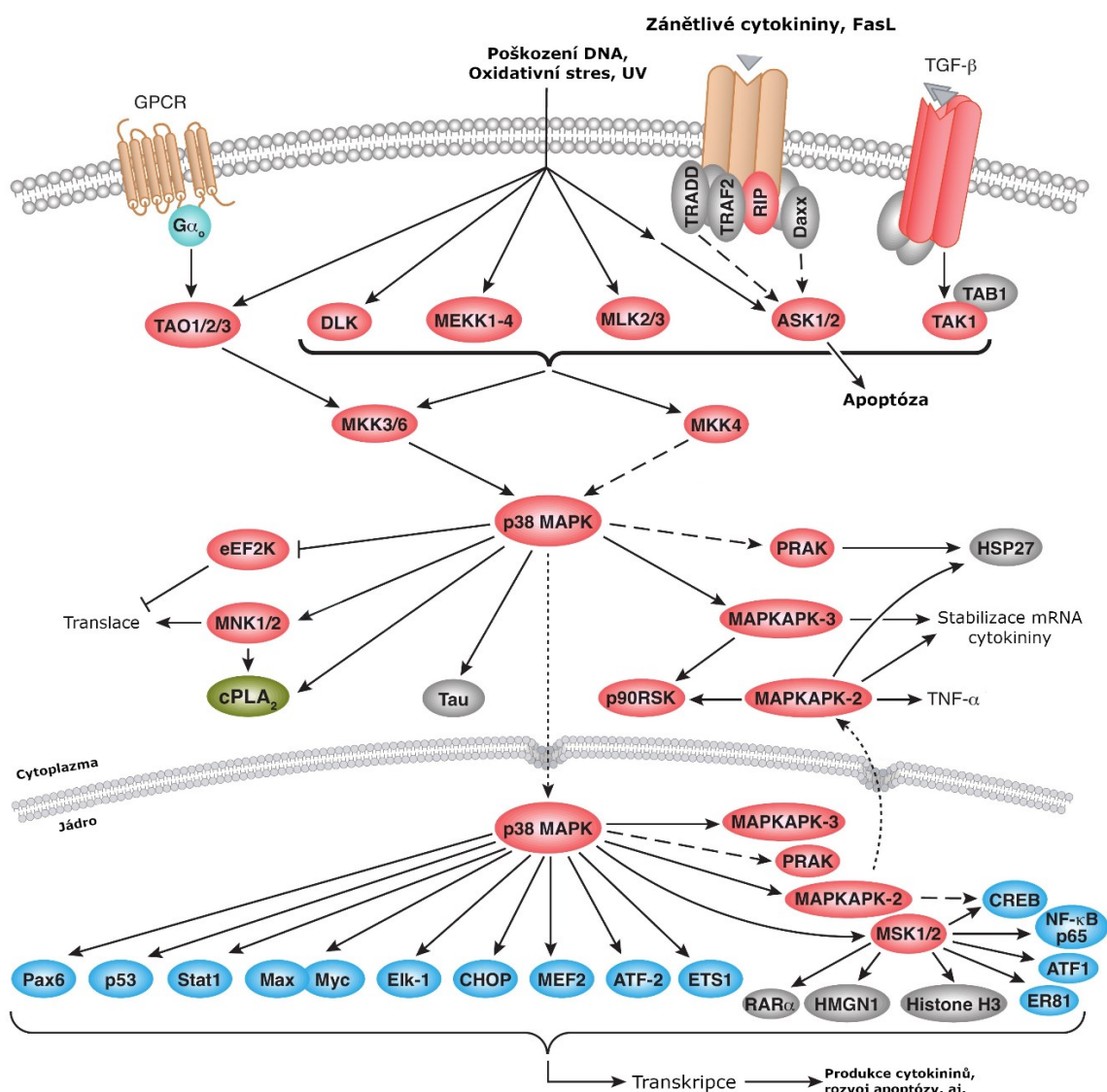
Rodina p38 je tvořena čtyřmi kinázami  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ , které jsou aktivovány řadou extracelulárních stresů a zánětlivých cytokinů. K jejich aktivaci dochází díky mitogen aktivovaným protein kinázám kinázám 3, 4 a 6 (MKK3/4/6). K aktivaci MKK3 a MKK6 dochází v důsledku fosforylace ASK1/2 (kináza regulující signál apoptózy), TAK1 ( $\beta$ -aktivovaná kináza 1 transformující růstový faktor), MLK3 (smíšené liniové kinázy), MEKK 1-4 (MAPK/ERK kináza kináza) a TAO (tisíc a jedna aminokyselina). (Bonney, 2017)

Je patrné, že signální události probíhající v MAP3K jsou poměrně složité. Rozmanitost této MAP3K regulace poskytuje ale buňkám řadu mechanismů schopných reagovat na rozmanité podněty.

Kináza p38 se podílí na regulaci HSP27, MAPKAPK-2 (MK2), MAPKAPK-3 (MK3) a několika transkripčních faktorů, včetně ATF-2, Stat1, komplexu Max / Myc, MEF-2, Elk-1 a nepřímo aktivaci CREB při aktivaci MSK1. (Cuadrado, & Nebreda, 2010)

- |                            |                           |                           |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| ● Kináza                   | ⬡ GAP/GEF                 | → Přímá stimulace         |
| ● Fosfatáza                | ● GTPáza                  | — Přímá inhibice          |
| ● Transkripční faktor      | ● G-protein               | ↗ Vícekroková stimulace   |
| ● Kaspáza                  | ● Acetyláza               | ↘ Vícekroková inhibice    |
| ● Receptor                 | ● Deacetyláza             | ↔ Pravděpodobná stimulace |
| ● Enzym                    | ● Ribozomální podjednotka | ↔ Pravděpodobná inhibice  |
| ● Pro-apoptotický protein  |                           | ↔ Rozdělení podjednotek   |
| ● Anti-apoptotický protein |                           | ↔ Spojení podjednotek     |
|                            |                           | ⋯ Transkolakce            |

Obrázek 12 - Legenda k obrázkům 13, 14 a 15

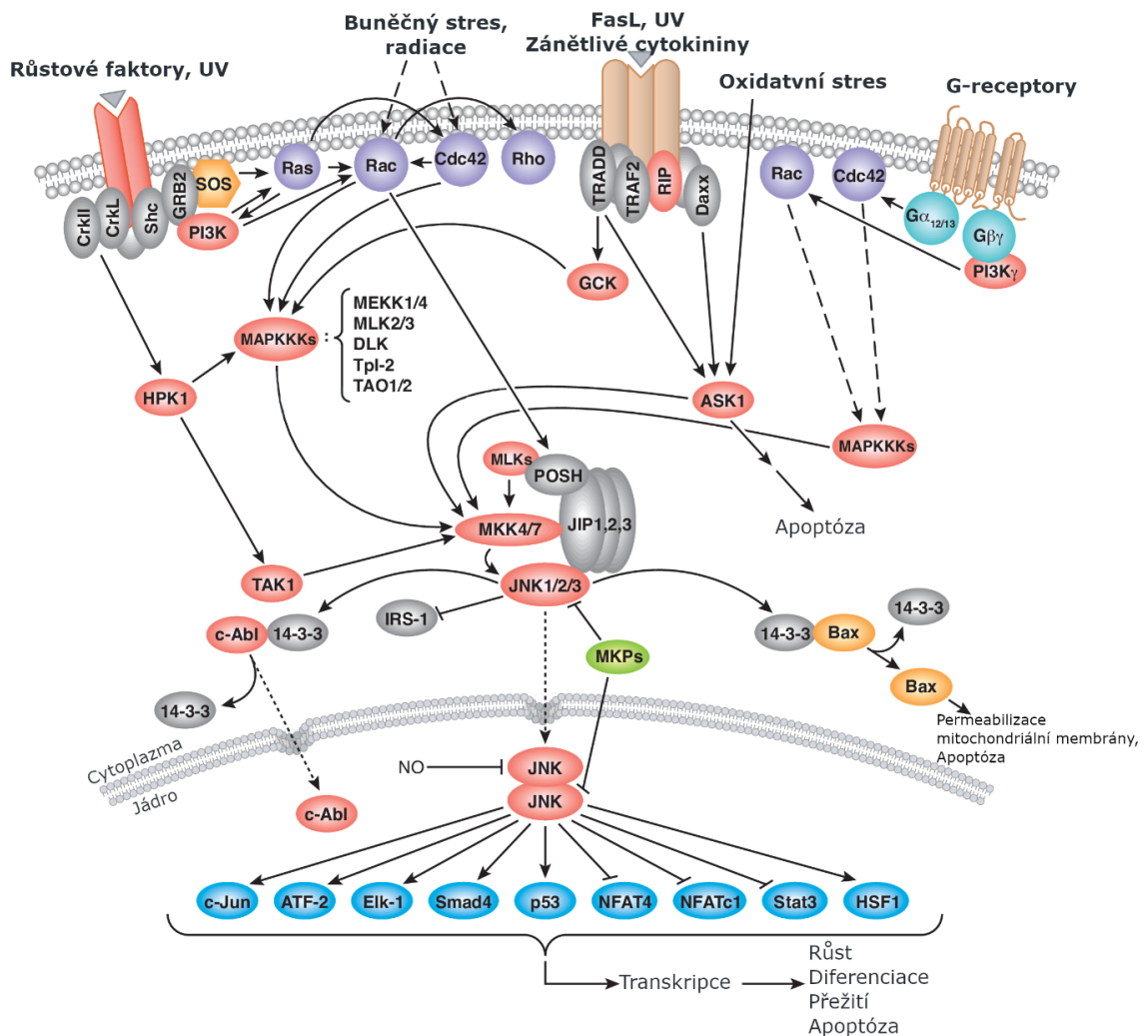


Obrázek 13 - Přehled p38 kinázy a jejich upstreamových a downstreamových cest

Převzato a upraveno z: („p38 MAPK Signaling”, 2012), "Ilustrace reprodukována se svolením Cell Signaling Technology, Inc."

### 4.3.2 JNK

C-Jun N-terminální kináza, jinak nazývaná také stresem aktivovaná protein kináza (SAPK), je kódována třemi geny (JNK1, JNK2 a JNK3), které jsou umístěny na třech různých chromozomech. JNK1 a JNK2 jsou syntetizovány ve všech tkáních, zatímco JNK3 je do značné míry omezena na mozek, srdce a varlata.



**Obrázek 14** - JNK kináza a přehled jejich upsteamových a downstreamových cest

Převzato a upraveno z: („SAPK/JNK Signaling Cascades”, 2012), "Ilustrace reprodukována se svolením Cell Signaling Technology, Inc."

Tyto kinázy jsou aktivovány dvěma MAPKK – mitogen aktivovanými protein kinázami kinázami 4 a 7 (MKK4/7). MAP3K zahrnují kinázu Raf, kinázu-1 regulující apoptózový signál (ASK1), MAP3K 1/4 (MEKK1/4), smíšené liniové kinázy (MLK) a další MAP3K aktivují MKK4 a MKK7 v signální dráze JNK. (Bogoyevitch & Ngoei & Zhao & Yeap, & Ng, 2010)

MAP3K jsou aktivovány rodinou GTPáz Rho, rodinou malých signalizačních G proteinů, jako je například protein kontrolního buněčného dělení 42(CDC42), a členy rodin Rac, Ras a Ras.

JNK v cytoplazmě aktivuje Bax protein. Následně se JNK přesouvá do jádra, kde může regulovat aktivitu více transkripčních faktorů, včetně c-Jun, ATF2, STAT3, p53 a další. (Vlahopoulos, & Zoumpourlis, 2004)

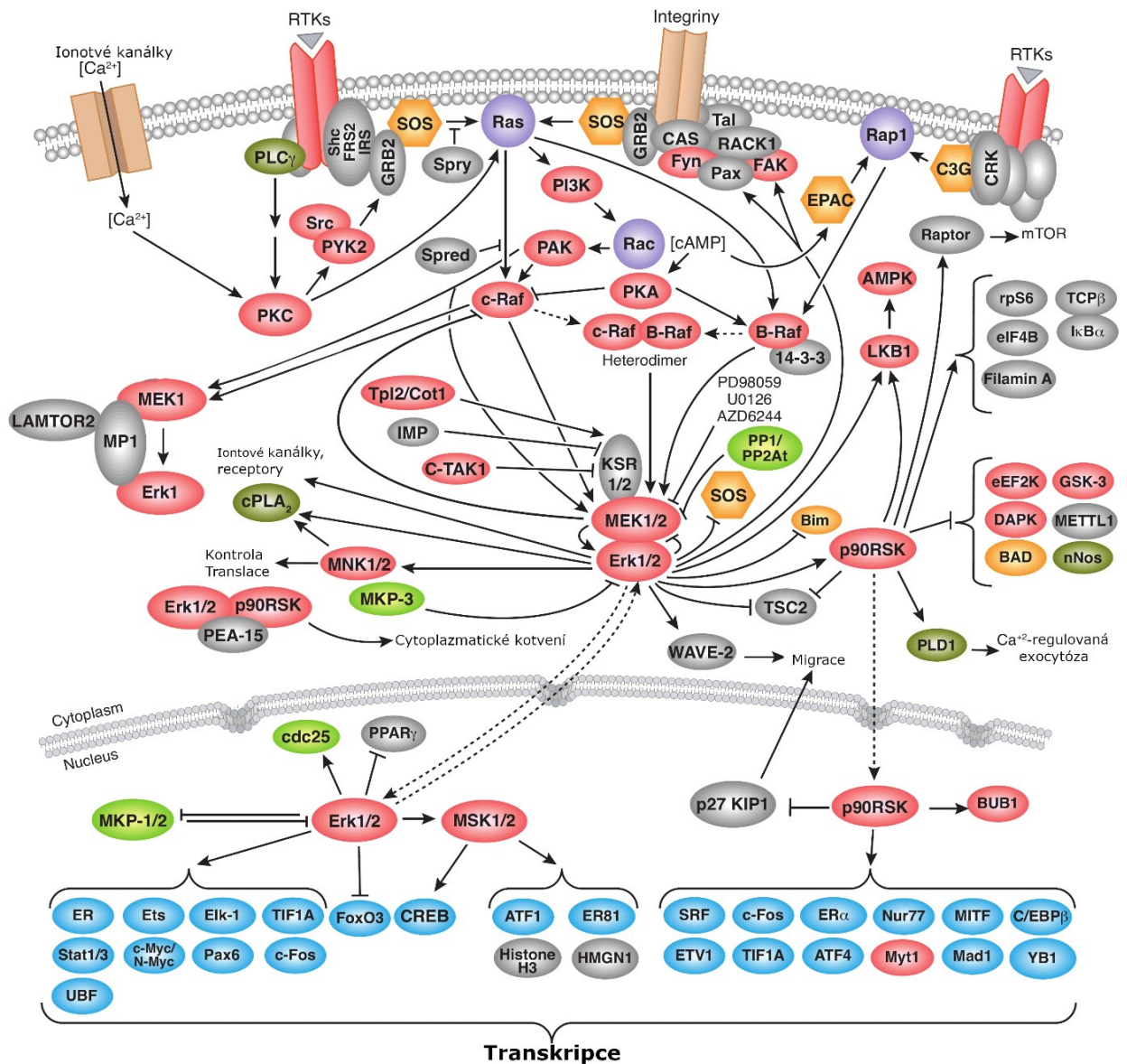
### **4.3.3 ERK**

ERK 1/2 kinázy jsou aktivovány řadou receptorů účastnících se buněčného růstu a diferenciaci. Těmito receptory mohou být receptor tyrosin kinázy (RTK), integriny, a iontové kanálky. Přesný průběh signální dráhy je závislý na typu podnětu. Aktivace ERK1/2 je spojena s anti-apoptotickými funkcemi, jako jsou kontrola proliferace a diferenciaci buněk. ERK hraje roli jak v inhibici pro-apoptotických proteinů (down regulace), tak v aktivaci anti-apoptotických proteinů (up regulace) prostřednictvím transkripčních a posttranslačních mechanismů. (Kim, & Choi, 2016)

ERK signalizační cesty obvykle zahrnují sadu adaptorových proteinů (Shc, GRB2, Crk atd.), které spojují receptor s guaninovým nukleotidovým výměnným faktorem (SOS, C3G atd.) Tyto faktory přenášejí signál na GTPázy (Ras, Rap1), které dále aktivují kaskádu složenou z MAPKKK (Raf), MAPKK (MEK1/2) a MAPK (Erk). Aktivovaný Erk dimer reguluje v cytosolu MNK1, a také se přesouvá do jádra, kde fosforyluje různé transkripční faktory regulující genovou expresi. Velmi důležitá je aktivace ribozomální s6kinázy, jinak zvané p90RSK.

Kináze p90RSK v buňce inhibuje aktivitu BAD proteinů a DAPK1 kinázy, které hrají pro-apoptickou roli. Dále zprostředkovává mitogenní a stresem indukovanou aktivaci transkripčních faktorů C/EBP, ETV1/ER, SRF a mnoha dalších, reguluje translaci fosforylací spS6 a eIF4B a zprostředkovává buněčnou proliferaci, přežití a diferenciaci modulací savčího targetu pro rapamycin (mTOR).

Hlavním údělem ERK signálních cest je regulace buněčné translace v návaznosti na působící stres a inhibice apoptózy. (De Luca, & Maiello, 2012)



**Obrázek 15** - Přehled ERK a jejich upstreamových a downstreamových cest

Převzato a upraveno z: („MAPK/Erk in Growth and Differentiation”, 2012), "Ilustrace reprodukována se svolením Cell Signaling Technology, Inc."



## 5 Role kináz při onemocněních

Díky své všudypřítomné roli MAPK řízené signální dráhy ovlivňují naprostou většinu dějů spojených s proliferací, diferenciací nebo apoptickou smrtí buňky (Peti, & Page, 2013). Patologické stavy těchto kináz jsou příčinou rozvoje mnoha onemocnění, včetně rakoviny a neurodegenerativních poruch, jako jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a amyotrofická laterální skleróza (Kim, & Choi, 2015). ERK hrají klíčovou roli ve vývoji mnoha typů rakoviny stimulací buněčné proliferace a metastázy. P38 přispívá k zánětům neuronů a je také spojována s rezistencí vůči léčivům používaných pro léčbu u rakoviny tlustého střeva a jater.

### 5.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je nejrozšířenější progresivní neurodegenerativní onemocnění u člověka. Dochází při ní k dysfunkci paměti a kognitivní poruše. Hlavním rysem progresu Alzheimerovy choroby (AD) je tvorba senilních plaků tvořených amyloidem  $\beta$  ( $A\beta$ ) a výskyt aberantní fosforylace proteinu tau spojeného s mikrotubuly v mozku postižených jedinců (Jakob-Roetne, & Jacobsen, 2009).

Bylo zjištěno, že asi 5 % jedinců s familiární formou AD má mutace v genech pro amyloidní prekurzorový protein (APP). APP je integrální membránový protein typu I, který je postupně štěpen  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  sekrečními enzymy. Samotný oxidační stres je klíčovým rizikovým faktorem pro patogenezi AD. Oxidativní stres indukovaný  $A\beta$  má za následek aktivaci p38 a následnou hyperfosforylaci tau kinázy.

Jedním z léčebných targetů je inhibice kinázy p38. Její inhibice pomocí proteinu CNI-1493 měla za následek snížení již přítomných senilních plaků na mozku a zároveň omezila produkci dalších  $A\beta$  indukovaných proteinů. (Bach, & Mengel, 2011)

### 5.2 Parkinsonova choroba

Toto onemocnění je druhou nejčastější neurodegenerativní poruchou a postihuje až 5 % jedinců starších 85 let. Nemoc je charakterizována klinickými příznaky klidového třesu, rigiditou a redukcí rychlosti pohybu. Fyzické příznaky Parkinsonovy nemoci jsou neuropatologicky indikovány ztrátou dopamin-produkujících neuronů a depozicí Lewyho tělísek v mozku. Pohybová porucha vzniká v důsledku sníženého množství dopaminu.



Podle výzkumů provedených na myších kinázy JNK, ERK a p38 přispívají různými způsoby k dopaminogenní degeneraci charakteristické pro Parkinsonovu chorobu. (Goedert, 2001)

Mutace genu Parkin, který je nejčastěji mutující gen při PD, způsobí jeho nefunkčnost. To vede k degradaci neuronů díky hyperaktivaci JNK kináz a zvýšené apoptóze.

Hlavní proteinové kinázy spojené se zvýšeným rizikem nemoci jsou domnělá putativní kináza 1 indukovaná PTEN a opakovaná kináza 2 bohatá na leucin (LRRK2), PINK1 a LRRK2. Tyto kinázy jsou regulovány jejich proteinovými kinázami B (AKT) a JNK signální dráhou (Kim, & Choi, 2015).

### **5.3 Rakovina**

Neomezená buněčná proliferace, diferenciací a absence apoptózy je jedním z charakteristických znaků nádorů. Kinázy díky své roli v buněčné regulaci zastávají neméně podstatnou roli během tvorby a vývoje nádorů v lidském organismu. Deregulace kinázové aktivity může vést k dramatickým změnám v buněčném cyklu, deregulované kinázy jsou často považovány za onkogenní a mohou být klíčové pro přežití a šíření rakovinných buněk (Hunter, & Cooper, 1985).

Existuje řada procesů, kterými se kinázy podílí na rakovině – chybně regulovaná exprese ať už přímá, upstreamová nebo downstreamová, aberantní fosforylace, mutace, chromozomální translokace a epigenetická regulace.

RAS/RAF/MAPK signální dráha je jednou z nejdůležitějších signálních drah ovlivňujících vývoj zdravé buňky a také tumorigenezi. Ras – Raf – MEK – ERK hraje ve vývoji rakoviny roli prostřednictvím stimulace proliferace a metastázování buněk nádoru. Mutace kináz K-Ras a B-Raf způsobuje opakovanou aktivaci downstreamových kináz, jako jsou ERK nebo mTOR, které podporují buněčnou proliferaci (Diaz-Flores & Goldschmidt, & Braun, 2013). Hyperaktivita ERK a JNK kináz byla detekována u rakovinných buněk při rakovině slinivky prsu a leukemii. JNK hraje také roli při vývoji rakoviny kůže díky spojení se s dalšími signálními drahami a svou hyperaktivací. Inhibice těchto kináz je zkoumána jako potenciální možnost léčby. (Cheung, & Yu, 2014)

Pochopení molekulárních mechanismů rezistence na léky u rakoviny je velmi důležité pro zlepšení terapeutické účinnosti protirakovinných látek. Část kináz svým působením totiž inhibuje svou aktivitou používaná léčiva, nebo činí rakovinné buňky proti nim odolné.

Příkladem je p38 zodpovědný za rezistenci vůči léčivům jako jsou cisplatina, irinotecan a 5-fluorouracil používaných při rakovině tlustého střeva (Grossi, 2014). Při rakovině jater způsobuje p38 rezistenci vůči multikinázovému inhibitoru sorafenibu, a zároveň aktivuje MER-ERK signalizační cestu. Pro efektivní léčbu je proto nutné také přidat inhibitory p38.

Přestože inhibitory signálních drah mají velký potenciál pro léčbu různých typů rakoviny, jejich účinnost je omezena mnoha mechanismy způsobujícími rezistenci na takto založená léčiva. Díky své provázanosti je zastavení signální dráhy pouze na jedné kináze často nedostatečné a efektivní léčba vyžaduje kombinaci inhibitorů, čímž se úměrně zvyšuje množství nežádoucích účinků (Kim, & Choi, 2015).

## 6 Závěr

Regulovaná buněčná smrt hraje důležitou roli během vývoje, udržování tkáňové homeostázy, zánětu, imunitních reakcí a při mnoha dalších patologických stavech.

Na jedné straně zvýšená aktivita RCD představuje primární příčinu u onemocnění, jako jsou infarkt myokardu nebo neurodegenerativní nemoci. Na druhé straně jsou poruchy v signálních kaskádách spojené se sníženou aktivitou RCD, a tím i nekontrolovanou proliferací nebo akumulací buněk, spojeny s řadou autoimunitních poruch a některých typů rakoviny. Studium těchto molekulárních mechanismů signálních drah je proto důležitým a slibným terapeutickým cílem. Díky provázanosti těchto drah je vývoj léčiv cílených pouze na jednotlivé nedostatečný a vyžaduje komplexní přístup – příkladem může být inhibice apoptózy, která má často za následek iniciaci nekroptózy jako záložního mechanismu. Provázanost těchto signálních drah je příčinou křehké rovnováhy mezi zdravým buněčným životem, smrtí a patologickými stavy.

Čím více budeme chápat vzájemnou provázanost jednotlivých drah, příčiny jejich aktivace a roli dodnes méně známých molekul, tím efektivněji budeme schopni vytvářet nová cílená léčiva na mnoho i dnes neléčitelných nemocí spojených s patologií signálních drah buněčné smrti, což je dozajista velká motivace pro další výzkum této oblasti.

## 7 Seznam použité literatury

1. Apoptosis Handbook. (2016). Novus Biologicals.
2. **Bach, J. a Mengel, D.** (2011). The Role of CNI-1493 in the Function of Primary Microglia with Respect to Amyloid- $\beta$ . *Journal of Alzheimer's Disease*, 26(1), pp. 69-80.
3. **Bogoyevitch, M., Ngoei, K., Zhao, T., Yeap, Y., et al.** (2010). c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: Recent advances and challenges. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(3), pp. 463-475.
4. **Bonney, E.** (2017). Mapping out p38MAPK. *American Journal of Reproductive Immunology*, 77(5).
5. **Bossemeyer, D.** (1995). Protein kinases - structure and function. *FEBS Letters*, 369(1), pp. 57-61.
6. **Bottone, M., Santin, G. a Aredia, F.** (2013). Morphological Features of Organelles during Apoptosis: An Overview. *Cells*, 2(2), pp. 294-305.
7. **Brenner, D. a Mak, T.** (2009). Mitochondrial cell death effectors. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), pp. 871-877.
8. **Brzozowski, J. a Skelding, K.** (2019). The Multi-Functional Calcium/Calmodulin Stimulated Protein Kinase (CaMK) Family: Emerging Targets for Anti-Cancer Therapeutic Intervention. *Pharmaceuticals*, 12(1).
9. **Cohen, P.** (2004). Overview of protein serine/threonine phosphatases. *Protein Phosphatases*, pp. 1-20.
10. **Creagh, E.** (2014). Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways. *Trends in Immunology*, 35(12), pp. 631-640.
11. **Cuadrado, A. a Nebreda, A.** (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal*, 429(3), pp. 403-417.
12. **D'Arcy, M.** (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), pp. 582-592.
13. **Das, G., Shrivage, B. a Baehrecke, E.** (2012). Regulation and Function of Autophagy during Cell Survival and Cell Death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), pp. a008813-a008813.

14. **De Luca, A. a Maiello, M.** (2012). The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(sup2), pp. S17-S27.
15. **Denton, D., Xu, T. a Kumar, S.** (2015). Autophagy as a pro-death pathway. 93(1), pp. 35-42.
16. **Diaz-Flores, E., Goldschmidt, H. a Braun** (2013). PLC- and PI3K Link Cytokines to ERK Activation in Hematopoietic Cells with Normal and Oncogenic Kras. *Science Signaling*, 6(304), pp. ra105-ra105.
17. **Dickson, D.** (2004). Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect?. *Journal of Clinical Investigation*, 114(1), pp. 23-27.
18. **Elmore, S.** (2007). Apoptosis: a Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), pp. 495-516.
19. **Friedlander, R.** (2003). Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. *New England Journal of Medicine*, 348(14), pp. 1365-1375.
20. **Galluzzi, L., Maiuri, M., Vitale, I., Zischka, et al.** (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. 14(7), pp. 1237-1243.
21. **Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J., Kepp, O. a Kroemer, G.** (2016). Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(11-12), pp. 2405-2410.
22. **Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S., Thorburn, A., et al.** (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. 25(3), pp. 486-541.
23. **Goedert, M.** (2001). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(7), pp. 492-501.
24. **Goodsell, D.** (2000). The Molecular Perspective: Caspases. *The Oncologist*, 5(5), pp. 435-436.
25. **Green, D., Oguin, T. a Martinez, J.** (2016). The clearance of dying cells: table for two. 23(6), pp. 915-926.
26. **Grossi, V.** (2014). p38 $\alpha$  MAPK pathway: a key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. *World Journal of Gastroenterology*, 20(29).

27. **Hengartner, M., Ellis, R. a Horvitz, R.** (1992). Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature*, 356(6369), pp. 494-499.
28. **Hunter, T. a Cooper, J.** (1985). Protein-Tyrosine Kinases. *Annual Review of Biochemistry*, 54(1), pp. 897-930.
29. **Chalah, A. a Khosravi-Far, R.** (2008). The Mitochondrial Death Pathway. *Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy*, pp. 25-45.
30. **Chen, Q., Kang, J. a Fu, C.** (2018). The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(1).
31. **Cheong, J. a Virshup, D.** (2011). Casein kinase 1: Complexity in the family. 43(4), pp. 465-469.
32. **Cheung, L. a Yu, S.** (2014). Naturally Occurring Neomorphic PIK3R1 Mutations Activate the MAPK Pathway, Dictating Therapeutic Response to MAPK Pathway Inhibitors. *Cancer Cell*, 26(4), pp. 479-494.
33. **Jakob-Roetne, R. a Jacobsen, H.** (2009). Alzheimer's Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(17), pp. 3030-3059.
34. **Jorgensen, I. a Miao, E.** (2015). Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunological Reviews*, 265(1), pp. 130-142.
35. **Kerr, J., Wyllie, A. a Currie, A.** (1972). Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), pp. 239-257.
36. **Kim, E. a Choi, E.** (2015). Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Archives of Toxicology*, 89(6), pp. 867-882.
37. **Kim, E. a Choi, E.** (2016). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802: 396-405.
38. **Kris, M., Natale, R., Herbst, R., Lynch, Jr, T. et al.** (2003). Efficacy of Gefitinib, an Inhibitor of the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase, in Symptomatic Patients With Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA*, 290(16).
39. **Krysko, D., Garg, A., Kaczmarek, A., Krysko, et al** (2012). Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(12), pp. 860-875.
40. **Lincoln, T., Dey, N. a Sellak, H.** (2001). Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle. *Journal of Applied Physiology*, 91(3), pp. 1421-1430.

41. **Majtnerová, P. a Roušar, T.** (2018). An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports*, 45(5), pp. 1469-1478.
42. **Manning, G.** (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, 298(5600), pp. 1912-1934.
43. MAPK/Erk in Growth and Differentiation. In: *cellsignal.com*. (2012). Cell Signaling Technology. Retrieved from: <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-pi3k-akt-mapk-signaling/mapk-erk-in-growth-and-differentiation/pathways-mapk-erk>
44. **Martinvalet, D., Zhu, P. a Lieberman, J.** (2005). Granzyme a Induces Caspase-Independent Mitochondrial Damage, a Required First Step for Apoptosis. *Immunity*, 22(3), pp. 355-370.
45. **McMurry, J.** (2012). *Organic chemistry*. (8th ed). Belmont: Brooks/Cole.
46. p38 MAPK Signaling. In: *cellsignal.com*. (2012). Cell Signaling Technology.
47. **Peti, W. a Page, R.** (2013). Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein Science*, 22(12), pp. 1698-1710.
48. **Poon, I., Lucas, C., Rossi, A. a Ravichandran, K.** (2014). Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), pp. 166-180.
49. **Proskuryakov, S., Konoplyannikov, A. a Gabai, V.** (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death?. *Experimental Cell Research*, 283(1), pp. 1-16.
50. **R. Green, D.** (2018). *Cell Death: Apoptosis and Other Means to an End, Second Edition*. (2). CSHL Press.
51. **Radha, V., Nambirajan, S. a Swarup, G.** (1996). Association of Lyn Tyrosine Kinase with the Nuclear Matrix and Cell-Cycle-Dependent Changes in Matrix-Associated Tyrosine Kinase Activity. *European Journal of Biochemistry*, 236(2), pp. 352-359.
52. **Riley, J., Malik, A., Holohan, C. a Longley, D.** (2015). DED or alive: assembly and regulation of the death effector domain complexes. 6(8), pp. e1866-e1866.
53. **Roskoski, R.** (2015). a historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, vol. 100, pp. 1-23.
54. **Sakkiah, S., Cao, G., Gupta, S. a Lee, K.** (2017). Overview of the Structure and Function of Protein Kinases. *Current Enzyme Inhibition*, 13(2).

55. SAPK/JNK Signaling Cascades. In: *cellsignal.com*. (2012). Cell Signaling Technology. Retrieved from: <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-kinase-signaling/sapk-jnk-signaling-cascades/pathways-mapk-sapk>
56. **Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S. a Kumar, S.** (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *22*(4), pp. 526-539.
57. **Shi, Y.** (2002). Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell*, *9*(3), pp. 459-470.
58. **Schaller, M., Borgman, C., Cobb, B., Vines, R., et al** (1992). pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(11), pp. 5192-5196.
59. **Singh, R., Letai, A. a Sarosiek, K.** (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(3), pp. 175-193.
60. **Varjosalo, M., Keskitalo, S., Van Drogen, A. a Gstaiger, M.** (2013). The Protein Interaction Landscape of the Human CMGC Kinase Group. *Cell Reports*, *3*(4), pp. 1306-1320.
61. **Vlahopoulos, S. a Zoumpourlis, V.** (2004). JNK: a Key Modulator of Intracellular Signaling. *Biochemistry (Moscow)*, *69*(8), pp. 844-854.
62. **Wu, H., Che, X., Zheng, Q. a Wu, A.** (2014). Caspases: a Molecular Switch Node in the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis. *International Journal of Biological Sciences*, *10*(9), pp. 1072-1083.
63. **Yan, G., Elbadawi, M. a Efferth, T.** (2020). Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Academy of Sciences Journal*, pp. 39-48.