

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

VLIV JNK KINÁZY V AKTIVACI APOPTÓZY
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Kateřina Antošová
VEDOUCÍ PRÁCE: Mgr. Jiří Handl
KONZULTANT: Mgr. Jan Čapek

2019

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCE

EFFECT OF JNK KINASE IN APOPTOSIS ACTIVATION

BACHELOR THESIS

AUTHOR: Kateřina Antošová

SUPERVISOR: Mgr. Jiří Handl

CONSULTANT: Mgr. Jan Čapek

2019

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., autorský zákon, 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. 6. 2019

.....
Kateřina Antošová

Ráda bych poděkovala svému konzultantovi Mgr. Janu Čapkovi za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a svému příteli za podporu a trpělivost.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLBCKÉHO DÍLA, UMĚLBCKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Antošová**
Osobní číslo: **C16218**
Studijní program: **B3012 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Role JNK kinázy v aktivaci apoptózy**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši o roli JNK kinázy v aktivaci apoptózy. V úvodní části bakalářské práce popište apoptotickou buněčnou smrt. Dále pak popište aktivční dráhy apoptózy spolu s charakterizací morfologických znaků a změn buněk, které tento druh buněčné smrti podstupují.
2. V hlavní části práce charakterizujte a popište mechanismus aktivace JNK kinázové dráhy ve vztahu k aktivaci apoptotické buněčné smrti a shrňte úlohu JNK kinázy v organismu. Následně vzájemně porovnejte ostatní aktivční dráhy apoptózy. V závěru práce se věnujte srovnání apoptózy s ostatními typy buněčné smrti.
3. Jako zdroj informací pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce využijte odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Informace přehledně zpracujte podle pokynů a doporučení školitele.

Rozsah grafických prací: dle potřeby

Rozsah pracovní zprávy: 25 s.

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Jiří Handl

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: Mgr. Jan Čapek

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: 21. prosince 2018

Termín odevzdání bakalářské práce: 4. července 2019

prof. Ing. Petr Ralenda, CSc.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Handl, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

ANOTACE

Bakalářská práce je věnována vlivu JNK kinázy v aktivační dráze apoptózy se zaměřením na strukturu JNK kináz, druhy, aktivační mechanismy a funkce v lidském těle. Struktura je složená ze dvou částí spojených oblastí, která se účastní aktivace JNK kináz prostřednictvím hydrofobních kapes fosforylací MKK4 nebo MKK7. Popsány jsou vlivy aktivace JNK kináz a mechanismy regulace průběhu celé aktivace. V závěru bakalářské práce je uvedena účast JNK kináz v metabolických drahách a zhodnoceno patologické působení při nadměrné nebo nedostatečné expresi aktivované JNK kinázy. K regulaci onemocnění jsou vyvíjeny inhibitory JNK kináz různých druhů a založených na rozdílných principech působení, proto je JNK kináza je potencionální terapeutický cíl. Apoptózu lze srovnávat s dalšími obdobnými mechanismy jako je nekróza nebo autofagie. Detekce apoptózy je založena na principu fluorescenčního pozorování či průtokové cytometrii.

KLÍČOVÁ SLOVA

JNK kináza, apoptóza, buněčná smrt, aktivační dráhy, terapeutický cíl

ANNOTATION

The bachelor thesis deals with the influence of JNK kinase in the activation pathway of apoptosis with a focus on the structure of JNK kinases, species, activation mechanisms and functions in the human body. The structure is composed of two parts linked regions that participate in the activation of JNK kinases via hydrophobic pockets by MKK4 or MKK7 phosphorylation. The effects of JNK kinase activation and mechanisms of regulation of the course of whole activation are described. At the end of the bachelor thesis is described the participation of JNK kinases in the metabolism path and evaluated the pathological effect of excessive or insufficient expression of activated JNK kinase. JNK kinase inhibitors of various species and based on different principles of action are being developed to regulate the disease, JNK kinase is a potential therapeutic target. Apoptosis can be compared to other similar mechanisms such as necrosis or autophagy. The detection of apoptosis is based on the principle of fluorescence observation or flow cytometry

KEYWORDS

JNK kinase, apoptosis, cell death, activation pathway, therapeutic target

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| 0. ÚVOD | 13 |
| 1. APOPTÓZA | 14 |
| 1.1. Apoptotické dráhy | 14 |
| 1.1.1. Vnější apoptotická dráha | 14 |
| 1.1.2. Vnitřní apoptotická dráha | 16 |
| 1.2. Regulace apoptózy | 17 |
| 1.2.1. Kaspázy | 17 |
| 1.2.2. Pro-apoptotické a anti-apoptotické faktory | 17 |
| 1.2.3. Pro-i anti-apoptotické regulátory | 18 |
| 2. JNK KINÁZA | 18 |
| 2.1. Druhy JNK kináz | 20 |
| 2.2. Struktura | 20 |
| 2.3. Aktivace JNK kináz v procesu apoptózy | 21 |
| 2.3.1. Vazba MKK4/MKK7 na JNK kinázu | 25 |
| 2.4. Signální dráha aktivovaných JNK kináz | 26 |
| 2.4.1. <i>Scaffold</i> proteiny | 29 |
| 2.5. Regulace JNK signálních drah | 30 |
| 3. FYZIOLOGIE A PATOLOGIE JNK SIGNÁLNÍCH DRAH | 32 |
| 3.1. Alzheimerova choroba | 33 |
| 3.2. Obezita | 34 |
| 3.3. Nádorové buněčné linie | 35 |
| 3.4. Inhibitory JNK | 38 |
| 4. DALŠÍ DRUHY BUNĚČNÉ SMRTI | 40 |
| 4.1. Morfologické znaky apoptózy | 40 |
| 4.1.1. Detekce apoptózy | 41 |
| 4.1.1.1. Průtoková cytometrie | 41 |
| 4.2. Autofagie | 42 |
| 4.3. Nekróza | 42 |
| 4.4. Důležité molekuly | 43 |
| 5. ZÁVĚR | 44 |

| | |
|------------------------|-----------|
| 6. ZDROJE | 45 |
|------------------------|-----------|

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

| | |
|--|----|
| Obr. 1: Apoptotické dráhy..... | 15 |
| Obr. 2: Struktura JNK kinázy..... | 19 |
| Obr. 3: Signální dráhy aktivace JNK kináz..... | 23 |
| Obr. 4: Mechanismy působení aktivované JNK kinázy..... | 27 |
| Obr. 5: Schématické znázornění působení <i>Scaffold</i> proteinů při aktivaci JNK kináz..... | 30 |
| Obr. 6: „ <i>Yin a Yang</i> “ vlastnosti JNK1 a JNK2 vzhledem k propagaci a regresi nádoru. | 35 |
| Obr. 7: Struktura nejznámějšího inhibitoru JNK kináz SP600125, C ₁₄ H ₈ N ₂ O, Pyrazolanthron..... | 39 |
| Obr. 8: Morfologické změny v průběhu apoptózy..... | 40 |
| | |
| Tab. I: Sekvenční řazení peptidů ve vazbě k příslušným MAPK ve směru C-N..... | 21 |
| Tab. II: Funkce přežívání buněk rakoviny JNK dle studie in vivo a in vitro v odlišných typech buněk..... | 36 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|--------|---|
| Apaf | Aktivační faktor 1 pro apoptickou proteázu |
| ApoBDs | Apoptotická tělíska |
| ASK | Apoptóza signál-regulující kináza 1 |
| ATF | Aktivační transkripční faktor |
| ATP | Adenosintrifosfát |
| Bcl-2 | <i>B-cell lymphoma-2</i> |
| Bid | BH3-interagující doména |
| CARD | Kaspáza aktivační a najímací doména |
| DLK | <i>Dual leucine zipper kinase</i> |
| DUSP | Duální-specifické fosfatázy |
| ELK | <i>ETS Like-1 protein</i> |
| FADD | Fas-sdružené smrtící domény |
| Fas-L | Fas-ligand |
| GADD | <i>The Growth Arrest and DNA Damage</i> |
| IAPs | Inhibitory apoptózy |
| IL | Interleukin |
| JIP1 | JNK vázající protein 1 |
| JNK | c-Jun NH ₂ terminální kináza |
| MAPK | Mitogen-aktivované protein kinázy |
| MEKK | Mitogenem aktivovaná proteinkináza kináza kináza |
| MLK3 | <i>Mixed-lineage kinase 3</i> |
| mTOR | Serin/threonin proteinkináza |
| NFAT4 | Nukleární faktor aktivovaných T-buněk 4 |
| NOD | Nukleotid vázající oligomerační doména |
| PUMA | 53-up regulační modulátor apoptózy |
| Rac1 | <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i> |
| RIPK | Receptor-interakční serin/threonin-protein kináza |
| ROS | Reaktivní formy kyslíku |
| SH3 | <i>Src homology 3</i> |
| SIRT | Sirtuin |
| Tab | TGF-β Aktivovaná kináza 1 vázající protein |
| TAK | <i>TGF-P-activated kinase</i> |

| | |
|-------------|---|
| TGF β | Receptory transformující růstový faktor β |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> |
| TNF | Tumor nekrotizující faktor |
| TNFR | Tumor nekrotizující receptor |
| TRAF | TNF receptor asociovaný faktor-2 |
| TRAIL | Smrtící receptorový ligand |
| Trx | Thyredoxin |
| Wnt | <i>Wingless/Int-1 receptor</i> |

0. ÚVOD

Mezi důležité činitele pro udržení celkové homeostázy řadíme JNK kinázu. Tato kináza JNK hraje důležitou roli v aktivaci apoptózy díky její schopnosti aktivovat i inhibovat proces apoptózy. Kinázy, neboli enzymy přenášející molekuly z energeticky bohatších donorů na energeticky chudší substráty, se kaskádovitě aktivují řadou přímých interakcí nebo díky pomocným proteinům. Reagují na podnět, který se šíří skrz buňku, až vyvolá buněčnou odpověď. Ta je klíčová v zachování rovnováhy a je závislá na vstupujícím stimulu. Celý průběh je kontrolován konkrétními molekulami a mechanismy, i tak je ale zaznamenávána nežádoucí nadměrná exprese JNK kináz způsobující řadu patologických procesů. Struktura i funkce JNK kinázy je podobná s p38 a ERK patřící do stejné rodiny MAPK. Z důvodu intenzivní studie všech vlastností a funkcí JNK kináz by se jednou mohly používat při léčbě rakoviny, diabetu nebo steatóze.

Tato bakalářská práce si klade za cíl popsat aktivační dráhu JNK kináz v rámci mechanismu apoptózy, fyziologické a patologické dopady a srovnání s ostatními typy buněčných smrtí.

1. APOPTÓZA

Termín apoptóza byl poprvé použit a popsán v roce 1972 a je spojen se jmény Kerr, Wyllie a Currie (Kerr *et al*, 1972). Apoptóza, neboli programovaná buněčná smrt, patří u mnohobuněčných organismů k velmi důležitým fyziologickým procesům, které se podílí na komplexním fungování těla jako celku. Uplatňuje se při spermatogenezi, embryogenezi nebo destrukci nádorových buněk (Shaha C. *et al*, 2010).

1.1. Apoptotické dráhy

Apoptóza je spouštěna biochemickými mechanismy, které označujeme jako proces její aktivace zahrnující apoptotické dráhy. Mezi základní aktivační dráhy patří cesta vnější a cesta vnitřní, které se vzájemně doplňují (Obr. 1). Vnější dráha je aktivována interakcí ligandu a receptoru. Jeden z odlišných mechanismů aktivace vnější dráhy je pomocí otvorů v buněčné membráně vzniklých působením perforinů, které uvolňují serinové proteinázy (granzymy). Tento mechanismus uskutečňují například *Natural-Killer* buňky. Vnitřní dráha se naopak aktivuje signálem z vnitřního prostředí buňky. Příkladem je metabolický rozvrat, nedostatek živin, vliv cytostatik, volných radikálů, zvýšená koncentrace vápenatých iontů, stresové situace (infekce, zvýšené teplo, vliv radiace). Dalším hlavním aktivačním mechanismem je aktivace proteinu p53 v případě poškození DNA (Koubek, 2010).

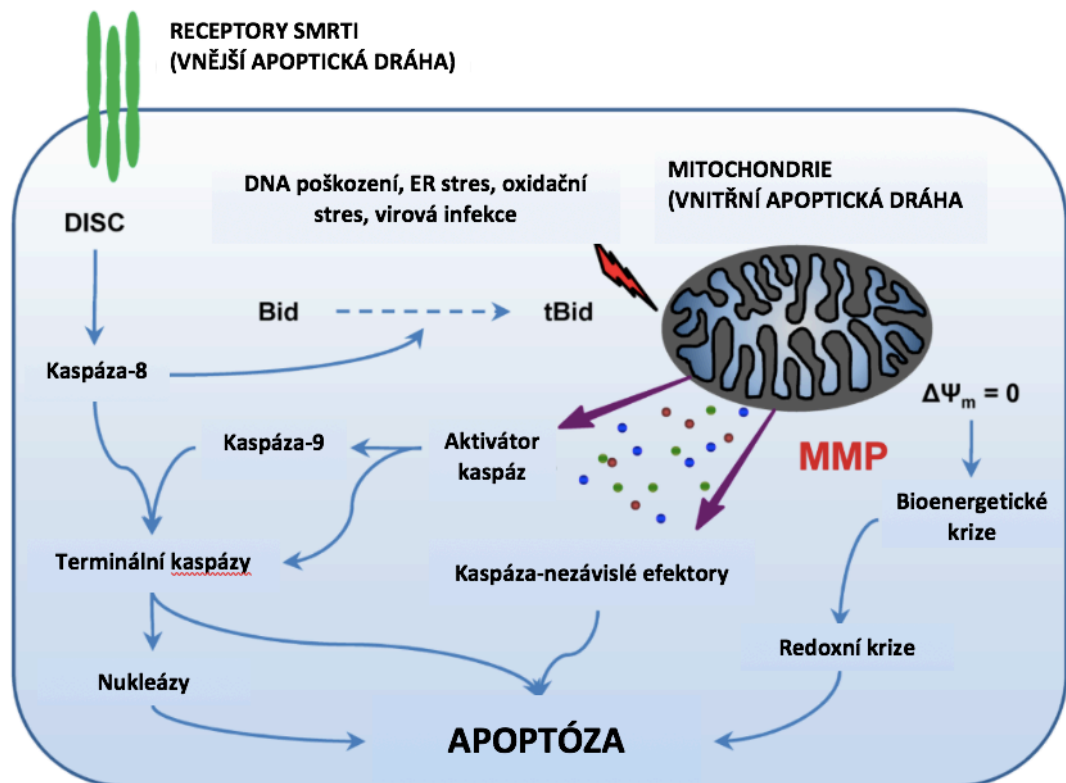
1.1.1. Vnější apoptotická dráha

Vnější aktivace apoptózy probíhá navázání ligandů smrti na receptory umístěné na povrchu cytoplazmatické membrány. Hlavními ligandy jsou Tumor Nekrotizující Faktor (*Tumor Necrosis Factor*; TNF), Fas-ligand (Fas-L) a Ligand indukující apoptózu (*Death effector domains*; TRAIL=APO-2). Receptorem TNF ligandu je TNF-receptor 1 nebo TNF- receptor 2 (TNFR-1/TNFR-2), pro Fas-L to je Fas-receptor (CD95). Faktor TRAIL má pět hlavních receptorů, mezi které řadíme TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) a osteoprotegerin (OPG) (Su Z. *et al*, 2015).

Interakcí ligandu TNF s příslušným receptorem způsobuje vznik trimeru TNF receptor zprostředkovaná smrtící doména (*TNF receptor-associated death domain*; TRADD), která zesiluje přenášejší signál. Následuje vazba na prokaspázu-8 tvořící

vazbu se smrtící efektorovou doménou. Autohydrolyzou probíhá aktivace prokaspázy-8 na kaspázu-8 společně s aktivací prokaspázy-3 na kaspázu-3, která je zodpovědná za rozštěpení intracelulárních proteinů při degradaci buňky.

Druhou možnou vnější cestou aktivace apoptózy je vazba Fas-L s příslušným receptorem za tvorby Fas-sdružené smrtící domény (*Fas-associated death domain*; FADD) aktivující prokaspázu-8. Celý komplex ligandu, receptoru a prokaspázy-8 se nazývá smrt-indukující signální komplex a nastává opět aktivace prokaspázy-8 a prokaspázy-3 (Xu X. *et al*, 2019).



Obr. 1: Apoptické dráhy.

(převzato a upraveno z Galluzzi L. *et al*, 2008); zkratky: DISC - smrt-indukující signální komplex; Bid – BH3-interagující doména smrti, tBid - Štěpný produkt Bid, MMP - Mitochondriální membránová propustnost, $\Delta\Psi_m$ - Mitochondriální transmembránový potenciál.

Dráha TRAIL je obdobná TNF Apoptotická cestě, ale účinek rozsahu aktivace dráhy zahrnuje i aktivaci T-buněk imunitního systému nebo destrukci nádorových buněk, proto je TRAIL znám i jako protirakovinotvorný činitel. Jeho vlastnosti ovlivňuje protein p53 vyskytující se ve zvýšené míře a pozměněné podobě v rakovinových buňkách. Velké množství rakovinových buněk je však na léčbu pomocí TRAIL rezistentní, probíhá však neustálý výzkum hledající účinnější formy

TRAIL. Jako první byl objeven RGD-TRAIL působící ve více nádorových buněčných liniích. Mezi výrazně účinnější formu řadíme TRAIL s Annexinem V, TP8. (Xu X. *et al*, 2019)

Propojení s vnitřní dráhou nastává, pokud se aktivací prokaspázy-8 rozštěpí protein Bid (BH3-interacting domain death agonist; BH3-interagující doména smrti) na tBid, který je transportován do mitochondrií. Výsledkem je konformační změna peptidu Bax, Bak a jejich oligomerů patřící do *B-Cell lymphoma-2* (Bcl-2 rodiny) uvolňující cytochrom c z mitochondrie za tvorby ApoBDs nebo interagující s Aktivačním faktorem 1 pro apoptickou proteázu (*Apoptosis proteas activating factor-1*; Apaf-1). Následuje aktivace prokaspázy-9 na kaspázu-9, která štěpí efektorové prokaspázy způsobující destrukci buňky (Chen Q. *et al*, 2018).

1.1.2. Vnitřní apoptotická dráha

Pokud je stimul spouštějící vnitřní dráhu přítomen, vyvolá rozvrat mitochondriální membrány, který je regulován proteiny Bcl-2 rodiny. V důsledku zvýšení permeability se tvoří Mitochondriální permeabilní přechodný pór, který umožňuje průnik pro-apoptotických faktorů, jako je cytochrom c, do cytosolu. Apoptozóm tvořen cytochromem-c, Apaf-1 a kaspázou-9, která spouští proteolytickou kaskádou efektorové kaspázy-3 vykonávající sebedestrukci buňky (Xu X. *et al*, 2019; Chen Q. *et al*, 2018; Su Z. *et al*, 2015).

Na kaspázách nezávislá vnitřní dráha je regulována s apoptóza indukovaným faktor. Tyto faktory jsou ukotvené na vnitřní membráně mitochondrie, odkud se pomocí jaderného lokalizačního signálu přemístí po štěpení kalpainu do jádra, kde štěpí DNA a způsobuje kondenzaci chromatinu (Xu X. *et al*, 2019).

Dráha závislá na endoplazmatickém retikulu aktivuje homeostatický rozvrat vápenatých iontů, nedostatek živin či hypoxie. Hlavní složkou je kaspáza-12 umístěná na membráně endoplazmatického retikula aktivována tvorbou komplexu s inozitol-vyžadující enzym-1- α -TNF receptor asociovaný faktor-2 (TRAF-2) komplex nebo díky kalpainu. Důsledkem tvorby komplexu dochází k přemístění kaspázy-9 z ER do cytosolu, což aktivuje kaspázu-3, která způsobí destrukci buňky (Chen Q. *et al*, 2018).

1.2. Regulace apoptózy

Celý průběh apoptózy je řízen pomocí regulačních proteinů a mechanismů rozlišující se podle působení a účinku.

1.2.1. Kaspázy

Mezi hlavní přímé regulátory patří kaspázy. Z chemického hlediska to jsou cysteinové proteázy hydrolyzující peptidové vazby v místě aspartánu (Koubek K., 2010). Lidský genom kóduje 15 kaspáz uložených intracelulárně v neaktivní podobě ve formě zymogenů, prokaspáz, vyžadující k aktivaci dimerizaci či štěpení (Chung, Pharm. D. Clement, 2018). Dimerizace je umožněna adaptačními proteiny vázající se na specifické oblasti v prodoméně prokaspáz. Konkrétní mechanismus vazeb závisí na buněčném adaptéru a na oblastech domén protein-protein uvnitř kaspáz. Mezi iniciační kaspázy se řadí kaspáza-8, kaspáza-9, kaspáza-2, kaspáza-10 aktivované dimerizací, která usnadňuje autokatalytické štěpení na jednu velkou a jednu malou podjednotku stabilizující vzniklý dimer. Mezi efektorové kaspázy se zahrnuje kaspáza-3, kaspáza-6 a kaspáza-7 aktivované štěpením iniciačními kaspázami. Štěpení mezi velkou a malou pojednotkou umožní konformační změnu, která aktivuje kaspázy spojením dvou aktivních míst dimeru (Mcllwain. *et al.*, 2013).

1.2.2. Pro-apoptotické a anti-apoptotické faktory

Rodina Bcl-2 zahrnuje 25 proteinů charakterizovaných přítomností BH-domén ve struktuře. Podle funkce rozlišujeme anti-apoptotické (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, A1), pro-apoptotické efektorové (Bak, Bax), pro-apoptotické přímé aktivátory (Bid, Bim) a na nepřímé aktivátory (Bad, Bik, Bmf, HRK, Puma, Noxa) (Ondroušková E., Vojtěšek B., 2014). Faktory mohou tvořit dimery pomocí BH-3 domén a způsobovat jejich inaktivaci. Jejich vzájemný poměr a interakce rozhoduje, zda bude apoptotická dráha inhibována nebo aktivována (Mcllwain. *et al.*, 2013).

Růstové faktory brání aktivaci kaspáz nebo je přímo inhibují. Členy Bcl-2 rodiny inhibuje Akt serin/threonin-proteinová kináza, další inhibitory jsou Bad nebo kaspáza-9. V mitochondriální cytoplazmě jsou přítomné malé molekuly způsobující inhibici proteinu inhibitoru apoptózy (*Inhibitor of apoptosis*; IAPs) – NAIP, c-IAP1/HAIP-2, c-IAP2/HAIP-1, XIAP/hILP, které jsou vyvazovány a inaktivovány

proteiny SMAC/DIABLO, ARTS nebo proteázou Omi/HtrA2 (Xu X., Lai Y., Hua Z., 2019; Ondroušková E., Vojtěšek B., 2014).

Dalším regulátorem je protein p53, jaderný transkripční faktor, považující se za klasický tumorový supresor. Hlavní funkcí je správná reakce na buněčný stres vyvolaný poškozením DNA vedoucí ke genomovým aberacím zahrnující mutaci, delecii nebo translokaci, jejichž akumulace může způsobit rakovinu. Chemická struktura zahrnuje tři funkční domény zahrnující NH₂-terminální kyselou transaktivační doménu, doménu vázající DNA a COOH-terminální oligomerizační doménu. Aktivaci proteinu p53 indukuje fosforylace a acetylace. Fosforylace nastává při reakci se Ser-15, Ser-20, Ser-46 v reakci na poškození DNA, NH₂-terminální fosforylace zvyšuje disociaci *Murine double-minute 2*, a tím aktivuje protein p53. Bylo dokázáno, že fosforylace ne vždy působí jako aktivátor, *Polo-itelike kinase-1* inhibuje prostřednictvím tohoto mechanismu. Acetylace je zprostředkována proteinem p300 interakcí s NH₂-koncovou oblastí proteinu p53 způsobující acetylaci COOH-terminálních Lys zbytků. Eliminace poškozené DNA je zprostředkována navázáním krátkého peptidu, ubikvitinu, na cílová místa ligace. Mezi inhibitory proteinu p53 patří proteinové fosfatázy PP-1, PP-2, které způsobují defosforylaci (Ozaki T., Nakagawara A., 2011).

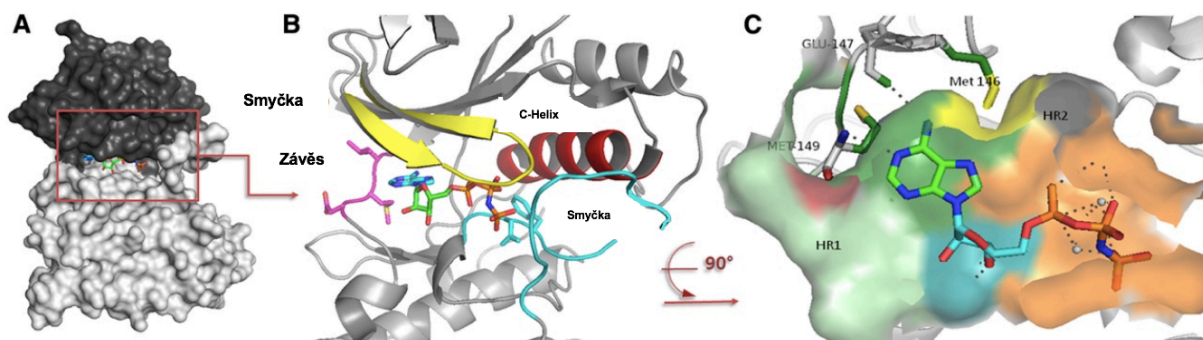
1.2.3. Pro-i anti-apoptotické regulátory

TNF- α je pleotropní cytokin s protinádorovými účinky, který má funkci proapoptickou, ale za určitých okolností může aktivovat transkripční nukleární faktor kappa-B, který indikuje expresi IAPs. Mezi podobný regulátor patří c-Jun N-terminální kináza (*c-Jun N-terminal kinases*; JNK) (Koubek K., 2010; Chung, Pharm. D. Clement, 2018).

2. JNK kináza

Rodina mitogen-aktivovaných protein kináz (MAPK) zahrnuje JNK kinázy (1-3), p38 kinázy (izoformy α , β , γ , δ) a extracelulární signál-regulované kinázy (*Extracellular signal-regulated kinases*; ERK 1,2,5). Název MAPK je odvozen od schopnosti fosforylovat serin/threonin specifické enzymové zbytky (Peti W., Page R., 2013).

Objevení JNK kinázy bylo v 90. letech 20. století v testování vazby c-Jun s extrakty z buněk HeLa, lidských epiteliálních buněk izolovaných z rakovinných buněk děložního hrdla Henrietty Lacksové, stimulované UV zářením. Bylo zjištěno, že JNK dráha je důležitou součástí buněčných procesů, mezi které patří například fosforylace transkripčního faktoru p53. Dále hraje důležitou úlohu u neurodegenerativních onemocnění, rakovin či diabetu (Okamura T. *et al*, 2015).



Obr. 2: Struktura JNK kinázy.
(převzato a upraveno z Peti W., Page R, 2013); zkratky: HR1 (hydrofobní oblast 1), HR2 (hydrofobní oblast 2).

Mezi další úlohu patří regulace embryonálního vývoje, nervového systému i imunity (Zeke A. *et al*, 2016). Důležitými vlastnostmi jsou schopnosti inhibovat i indukovat apoptózu. Rozhodujícím faktorem je typ buněk, povaha stimulace buněčné smrti a úroveň aktivita jiných signálních drah. Aktivace této dráhy je indukována biotickými či abiotickými stresovými událostmi (ionizující záření, teplo, oxidační stres, poškozením DNA, zánětlivé cytokiny, růstové faktory, infekce, zánět, cytoskeletární změny).

Jednou z důležitých rolí při volbě buněčného mechanismu smrti je vlastnost klíčových molekul. Vysoká hladina ATP podněcuje proces apoptózy, nízká hladina ATP naopak nekrozu. Proto nadměrná spotřeba ATP nebo inhibice ATP může vést k přechodu z apoptózy do nekrozy a naopak. Důležitou roli má aktivovaná kaspáza-8, která za normální aktivity indukuje apoptickou dráhu. Pokud je její aktivita farmakologicky inhibována (například pomocí kaspáz inhibitoru ZVAD) nebo geneticky inhibována (RNAi-mediovaná inhibice), aktivují se fosforylací Receptor-interakční serin/threonin-protein kináza 1/3 (*Receptor-interacting serine/threonine-*

protein kinase 1/3; RIPK 1/3), které indukují tvorbu nekrozómu a následnou nekroptózu (Chen Q. *et al*, 2018).

2.1. Druhy JNK kináz

Název JNK kinázy je odvozen od schopnosti fosforylovat serinové zbytky v polohách 63 a 73 v amino-termální doméně c-Jun protoonkogenu. Lidský genom má schopnost kódovat 3 druhy JNK kináz, JNK1 (Mapk8), JNK2 (Mapk9) a JNK3 (Mapk10) na chromozomech 10q11.22, 5q35, 4q21.3 v tomto pořadí. Každý druh je exprimován ve formě krátké (46 kDa) a dlouhé (54 kDa) a v několika isoformách vzniklých alternativním sestřihem. Nejčastějším místem je spojení C-koncového laloku kinázové domény a použití dvojice vzájemně se vylučujících šestých exonů (Zeke A. *et al*, 2016).

První dvě JNK kinázy jsou exprimovány téměř ve všech tkáních lidského těla, ale JNK3 pouze v mozku, varlatech a srdci. Eliminace obou JNK1 i JNK2 vede k fetální letalitě, zatímco eliminace buď JNK1 nebo JNK2 nezpůsobuje smrtelné následky (Grynberg K. *et al*, 2017).

2.2. Struktura

Primární struktura JNK kinázy obsahuje N-terminální lalok s pěti spletenými β -skládanými listy a C-terminální lalok s šesti α -helixy (Obr. 2). Oba laloky jsou spojené závěsem smyčky. Funkcí C-terminálního laloku je hlavně koordinace ATP a ovlivnění substrátové vazby. Důležitým rozšířením na N-terminálním laloku je KIM-doména obsahující 13-16 aminokyselinových sekvencí, které umožňují interakci s buňkou a podporu selektivity kinázy. Ostatní domény ovlivňují její specifčnost (Tab. I).

Závěs smyčky je tvořen 5 částmi, které jsou Ala (113/151) -Asp (112/150) -Met (111/149) -Leu (110/148) -Glu (109/147) a uplatňují se hlavně při vazbě na substrát. Další oblastí je ATP-vázací oblast. Dokovací oblast se skládá z dokovací hydrofobní drážky a záporně nabitě CD oblasti, což umožňuje vazbu na dokovací motivy cílových proteinů. Dokovací drážka má lineární charakter a obsahuje 3 hydrofobní kapsy tvořené vždy z jednoho pozitivně nabitého zbytku (Arg/Lys) a sérii hydrofobních zbytků propojených linkrem s proměnlivou délkou. Tato skutečnost mimo jiné odlišuje JNK kinázy od ostatních členů MAPK rodiny, které mají 4 hydrofobní kapsy, a tím pádem delší hydrofobní drážku. Důvodem je rozdílnost

navázaných zbytků. U ERK kinázy jsou navázanými zbytky E81 a D321, záporně nabitý zbytek E81 je u JNK kinázy nahrazen kladně nabitým zbytkem K84 s delším postranním řetězcem E329. Poloha E329 stabilizuje zbytek K83, a tím pádem i čtvrtou hydrofobní kapsu φ_u (Peti W., Page R., 2013). U JNK kináz jsou přípustné dva hlavní motivy vazby, kterými je nukleární factor aktivovaných T-buněk 4 (*Nuclear factor of activated T-cells 4*, NFAT4) třída tvořící krátký helix a JNK vázající protein 1 (*JNK interacting protein 1*; JIP1) třída. U motivu NFAT4 třídy máme v tomto pořadí navázaný pozitivně nabitý zbytek, 2 libovolné AMK a 3 hydrofobní kapsy střídající se s libovolnými AMK. Struktura JIP1 motivu je obdobná, ale první hydrofobní kapsa se nachází za pozitivně nabitým zbytkem následovaný 2 libovolnými AMK a střídajícími hydrofobními kapsami s AMK. Struktury NFAT4 a JIP1 mají motiv dle pořadí $\theta - x - x - \varphi_L - x - \varphi_A - x - \varphi_B$; $\theta - \varphi_L - x - x - \varphi_A - x - \varphi_B$ (Zeke A. et al, 2016).

| JNK | Sekvence | Sekvence | MAPK |
|------|----------|----------|-------|
| JNK1 | FLNLTTP | RKP | JIP1 |
| JNK1 | ELPLY-L | HDRSPR | NFAT4 |
| JNK3 | PLDLGSP | RVV | SAB |
| JNK3 | FKLT-M | EHK | AFT2 |
| JNK3 | FLNLTTP | RKP | JIP1 |

Tab. 1: Sekvenční řazení peptidů ve vazbě k příslušným MAPK ve směru C-N. (převzato a upraveno z Peti W., Page R., 2013).

2.3. Aktivace JNK kináz v procesu apoptózy

Dráha JNK kinázy je řízena přenosem signálů, které jsou označovány jako třístupňové MAPK dráhy a jsou tvořeny třemi úrovněmi kináz. Nejvyšší úroveň kináz označovaná MAP3K (MAP-kináza kináza kináza) umožňuje vstup do signálních drah, přijímá signály. Do této skupiny řadíme DLK, MLK3, TAK1, MEKK1, ASK1, ASK2, MEKK4. Střední úroveň kináz tvořená MAP2K (MAP-kináza kináza) zprostředkovává aktivaci hlavních molekul, v našem případě MKK4 a MKK7. Nejnižší úroveň kináz MAPK se podílí na tvorbě odpovědi a je efektoem drah JNK kinázy. Tento mechanismus umožňuje lepší koordinaci a odezvu na přijímaný signál (Obr. 3). Doba odezvy na signální podněty nastává v rámci několika minut a je přechodná.

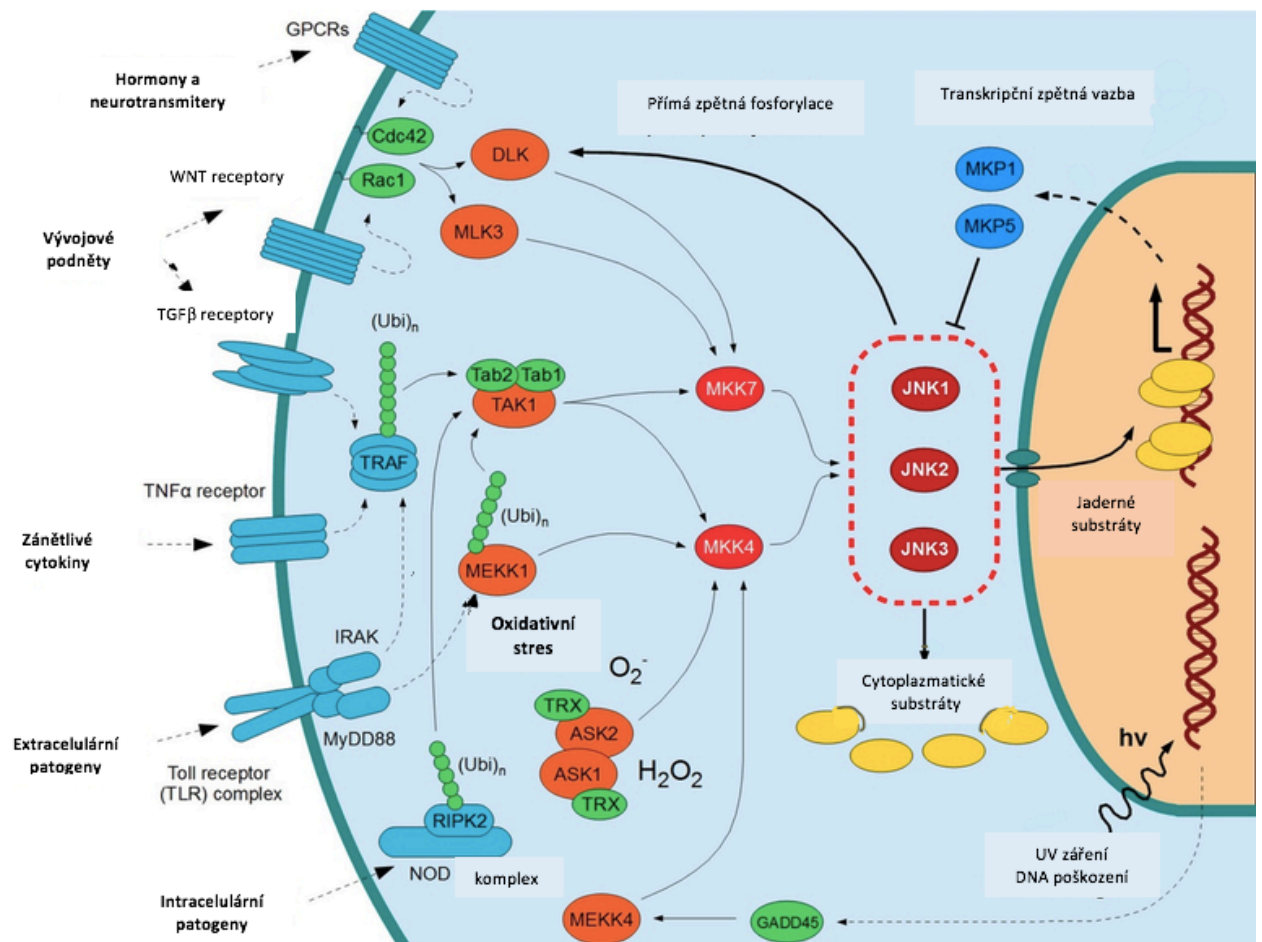
Hormony a neurotransmitery se naváží na receptory spřažené s G proteinem, které se nachází na vnější straně membrány. Vazba způsobí změnu konformace receptoru, čímž je komplex signální molekula-receptor aktivován. Z vnitřní strany membrány se naváže G-protein, který je tvořený třemi podjednotkami α , β , γ .

Následně nastává rozrušení vazby receptor-G-protein. Podjednotka α navázána na receptor se naváže v cytosolu na protein homologu kontrolního proteinu buněčného dělení 42 nebo na Rac1 protein (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*). Oba patří do rodiny Rho malých GTPáz a mají schopnost aktivovat MLK3 (*Mixed-lineage kinase 3*) a DLK (*Dual Leucine zipper kinase*). U DLK se oblast stočené spirály naváže na N-konec segmentu neuspořádaného MKK7 a fosforylací na Thr277/Ser281 se aktivuje (Zeke A. *et al*, 2016; Win p. *et al*, 2018).

Jiná možná aktivace MKK7 je proteinem MLK3. V tomto případě předchází aktivaci autoinhibice proteinovými ligandy a po úlevě se MLK3 alostericky dimerizuje interakcí doménou stočené spirály a aktivuje se. Aktivní forma umožní vazbu na neaktivní MKK7, a tím komplex aktivuje.

Mezi vývojové podněty aktivující JNK dráhu patří Wnt signalizace a TGF β signalizace. Receptor Wnt (*Wingless/Int-1 receptor*) je klíčový v embryonálním vývoji, podílí se na vývoji končetin, mozku a dalších orgánů. Na vnější straně membrány je Wnt receptor, na který se naváže glykoprotein z Wnt rodiny na Fz ko-receptor (dle studií zahrnují NRH1, Ryk, PTK7, ROR2). Následuje vazba vzniklého komplexu na *Drosophila disheveled gen*, čímž se aktivuje. Hlavní úlohu v aktivaci Rac1 má DEP doména vyskytující se na *Drosophila disheveled genu* (Gordon K. J., Blobel G. C., 2008). Následuje aktivace MLK3/DLK, aktivace MKK7 a fosforylací aktivace JNK kinázy.

Receptory transformující růstový faktor β (*Transforming growth factor β* ; TGF- β) aktivují TRAF adaptorový protein (*TNF receptor associated factor*; TNF receptorem asociovaný faktor) ubikvitinací Lysinu 63 (K63). Dříve je klíčový ubikvitin-konjugační enzymový komplex Ubc13-Uev1A, který modifikuje TRAF2. Následně komplex ubikvitin-ligáza E3 způsobí rozpad TRAF2 na nerozpustné cytoskeletární komplexy vázající se zinkovým prstem na domény Tab1/2 (*TGF- β Activated Kinase 1 Binding Protein 1/2*; TGF- β Aktivovaná kináza 1 vázající protein 1/2).



Obr. 3: Signální dráhy aktivace JNK kináz.

(převzato a upraveno ze Zeke A. et al, 2016); zkratky: MAP3K-DLK (Dual leucine zipper kinase), MLK3 (Mixed-lineage kinase 3), TAK1 (TGF-*P*-activated kinase 1), MEKK1 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1), ASK1/2 (Apoptóza signál-regulující kináza 1/2), MEKK4 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4); JNK kinázy (c-Jun NH₂ terminální kináza); Cdc42 (Homolog kontrolního proteinu buněčného dělení 42), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), Tab1/2 (TGF- β Aktivovaná kináza 1 vázající protein 1/2), TRX (Thiredoxin), GADD45 (The Growth Arrest and DNA Damage); GPCRs (Receptory spřažené s G proteinem), Wnt (Wingless/Int-1 receptor), TGF β (Růstový faktor β), TNF α (Tumor nekrotizující faktor α), TLR receptor (Toll-like receptor), NOD (Nukleotid vázající oligomerizační doména), RIPK2 (Receptor-interakční serin/threonin-protein kináza 2), TRAF (TNF receptorem asociovaný faktor), MKP1/5 (Mitogenem-aktivované protein kináza fosfatáza 1/5).

Klíčovou roli v tomto kroku má RING doména umístěná na N- konci, protože má schopnost rozpoznat proteiny určené k degradaci (Laine A., Ronai Z., 2005). Vazba Tab1/Tab2 na TAK1 (TGF-*P*-activated kinase 1) způsobí konformační změnu a je sprostředkována vazbou -COOH konce na TAK1 z důvodu výskytu oblasti bohaté na serinové a threoninové zbytky podobné oblasti v NH₂ konci TAK1 (Shibuya H. et al, 1996). Aktivovaný TAK1 má schopnost aktivovat MKK4/MKK7 a ty fosforylací aktivovat JNK kinázy (Wuerzberger-Davis Shelly M., 2010).

Zánětlivé podněty spouští TNF α signální dráhu. Vazba TNF signálu na TNFR1 receptor umožní trimerizaci TNFR1, což posílí adaptor TRADD díky interakcím smrtících domén. Utvoří se komplex zahrnující TRADD-RIP1-TRAF2. Následuje odštěpení RIP1 z komplexu K63 deubikvitinací, což aktivuje TRAF adaptorový protein. Disociovaný komplex váže FADD, kaspázu-8, RIP1 a RIP3 do formy druhého komplexu. Kaspáza-8 štěpí RIP1 a RIP3, a tím indukuje apoptózu. Pokud by se tak nestalo a kaspáza-8 či FADD byl inhibován, nenastala by apoptóza ale nekroptóza (Seki E. *et al*, 2012).

Dalším signálním podnětem jsou extracelulární patogeny, na které reaguje TLR receptor (*Toll-like receptor*). Oligomerace s *Myeloid differentiation primary response 88* umožňuje vazbu na s Interleukin-1 receptorem asociovanou kinázu 1 a E3 ubikvitin ligázy TRAF6 (Ippagunta S. K. *et al*, 2018). Následně dochází k vazbě na MEKK1 (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*) díky rostlinné homodoméně, která má funkční podobnost s RING doménou a je umístěna na N-konci. Následuje autofosforylace MEKK1, tím dochází ke konformační změně a aktivaci. Aktivní forma dále fosforyluje MKK4, která fosforylací aktivuje JKN kinázy (Laine A., Ronai Z., 2005). Jinou možností je vazba aktivované MEKK1 na Tak1 vázající Tab1, která je umožněna díky PHD doméně (Suddason T. *et al*, 2016).

Na stimulaci intracelulárními patogeny reaguje NOD doména (*Nukleotid-binding oligomerization domain 2*; nukleotid vázající oligomerační doména) reagující na bakteriální peptidoglykany, které uvolňují muramylové dipeptidy. Po stimulaci nastává oligomerizace a vazba na RIPK2 přes domény CARD-CARD (*Caspase activation and recruitment domains*; Kaspáza aktivační a najímací doména). Následuje autofosforylace a polyubikvitinace K63, což umožní vazbu na Tab1/Tab2 a následně na TAK1, který umožní aktivaci MKK4/MKK7 (Magalhaes G. J. *et al*, 2011).

Dráha reagující na reaktivní formy kyslíku (ROS) se aktivuje při oxidačním stresu, stresu endoplazmatického retikula, nadbytku Ca²⁺ iontů, zánětlivými cytokiny a infekcí. Tato cesta je důležitá v procesech týkající se přirozené imunity a virových infekcí. Detekce hladin Ca²⁺ iontů je umožněna díky vazebnému proteinu vázající vápenaté a integrinové molekuly (Win p.*et al*, 2018). Signál zpustí oxidaci cysteinů antioxidantu Trx (*Thiredoxin*), která umožní disociaci Trx z ASK1 kinázového komplexu (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*; Apoptóza signál-regulující kináza 1). Vazba mezi Trx a ASK1 je umožněna přes N-koncové kinasové *coiled-coil* domény

a vyskytuje se pouze při acidobazické rovnováze organismu, která udržuje ASK1 v neaktivní formě. Uvolněním této vazby nastává konformační změna oligomeru ASK1 skrz N-koncovou stočenou cívku, která způsobí autofosforylaci threoninového zbytku Thr845 nacházejícího v aktivační smyčce kinázové domény. Tím se ASK1 aktivuje, fosforyluje MKK4 a aktivuje JNK kinázy (Santabárbara-Ruiz P. *et al*, 2019; Kovalic A. J. *et al*, 2018; Hattori K. *et al*, 2009).

Vliv UV záření, rentgenové záření, nízké pH, hypoxie, hyperosmotický nebo onkogenní stres aktivují transkripční činnost GADD45 proteinů (*The Growth Arrest and DNA Damage*), GADD45 α , GADD45 β a GADD45 γ . Tyto proteiny jsou neenzymatické, mechanismus reakcí je tedy možný pouze interakcemi s proteinovými partnery nebo modulací přístupu DNA k příslušným proteinům. Aktivace spočívá v navázání na N- konec MEKK4 kinázi (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4*), která vyvolá konformační změnu vedoucí k autofosforylaci a aktivaci. Aktivovaný komplex následně specificky fosforyluje MKK4 (Moskalev A. A. *et al*, 2012). Tyto proteiny mohou mít i anti-apoptotické účinky. V hematopoetických buňkách vlivem UV záření GADD45 α,β aktivuje nukleární faktor kappa-B-p38 dráhu přežití zahájením opravy DNA, dále zábrana apoptózy nastává u nervů míchy po odnětí růstového faktoru. Oprava DNA je umožněna díky přímé interakci se 4 histony jádra, což umožňuje demethylaci DNA (Salvador J. M. *et al*, 2013).

2.3.1. Vazba MKK4/MKK7 na JNK kinázu

Přímou aktivaci JNK kináz zprostředkovává MKK4/MKK7 skrz duální fosforylaci aktivační smyčky dle motivu Thr-Pro-Tyr. Molekulární rozpoznávání je zprostředkováno prostřednictvím dokovacích míst, která nesou homologní sekvence rozpoznání. Principem je navázání bazických zbytků MKK4/MKK7 na záporně nabitá dokovací místa JNK kináz a vložení hydrofobních zbytků MKK4/MKK7 do hydrofobních kapes na povrchu JNK kináz. Komplex MKK7 obsahuje 3 dokovací místa D1, D2 a D3 na N-konci. V roce 2015 byla provedena experimentální studie vaznosti JNK1 na 3 rozdílná dokovací místa pomocí isothermální titrační kalometrie. Bylo zjištěno, že JNK1 se váže na všechny dokovací místa pouze s malým rozdílem afinit stejně a jedna molekula MKK7 je schopna vázat 3 JNK molekuly (Kragelj J. *et al*, 2015). Hlavním motiv vazby MKK7 na JNK kinázu je dle NFAT4, alternativní dle JIP1. To, že jsou možné oba konformační motivy, vypovídá o schopnosti molekuly MKK7 oscilovat mezi těmito motivy. U molekul, které mohou interagovat s MKK4

i MKK7 je rozhodující výchozí stimul. Vazba MKK4 na JNK nastává prostřednictvím 1 dokovacího místa, které se nachází na N- konci. Přednostní aktivace MKK7 je u IL-1, TNF- α . MKK7 výhradně u JNK. MKK4 i u p38.

2.4. Signální dráha aktivovaných JNK kináz

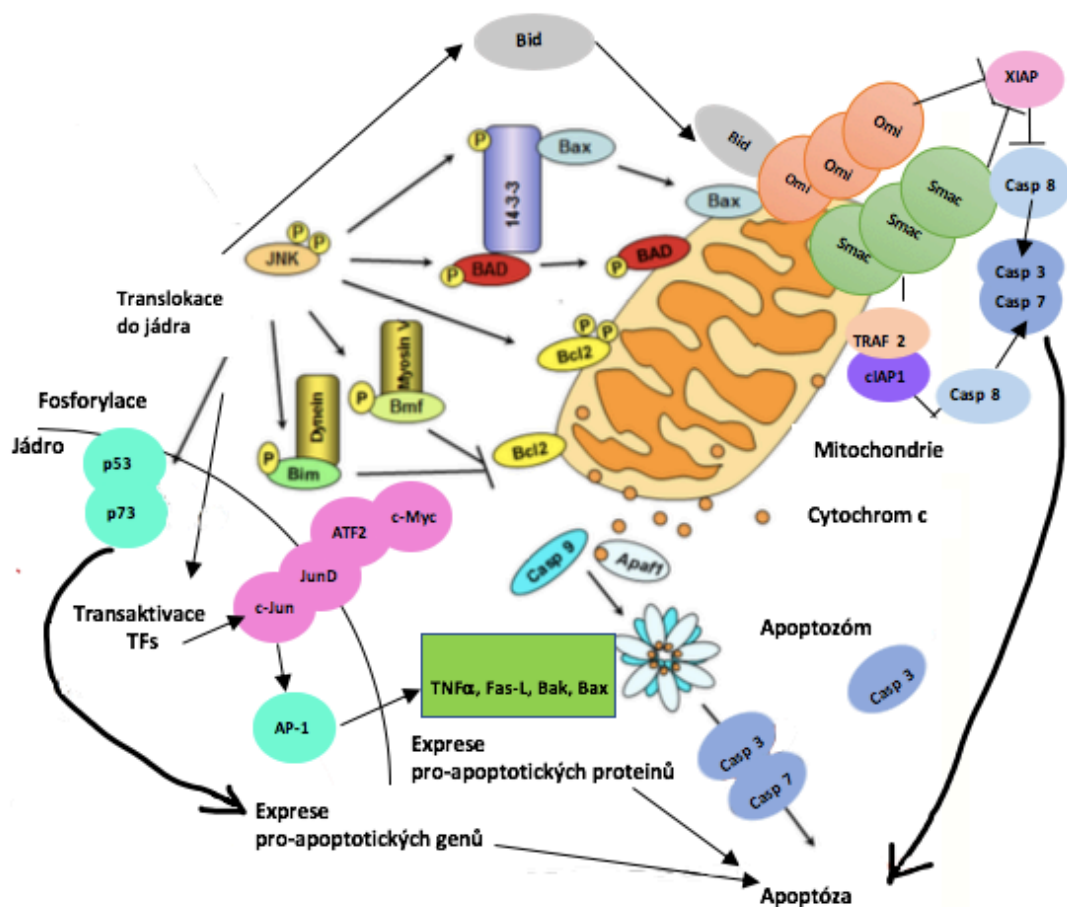
Aktivovaná JNK kináza reaguje dle typu buněk a příslušného přijímaného signálu, všechny tyto cesty se s největší pravděpodobností neuskuteční ve stejném typu buněk (Obr. 4). Možná interakce je až s 50 různými molekulami. Primárním cílem je zvýšení exprese pro-apoptotických jaderných genů, jako je c-Jun, p53 nebo p73. Dále může JNK kináza přímo fosforylovat nejaderné substráty, mezi které patří cytoskeletární proteiny (DCX, MAP1B, WDR62), mitochondriální proteiny, ubikvitin-proteinové ligázy, adaptorové proteiny, adhezivní proteiny (paxilin, katenin) a ostatní proteinové kinázy.

Přímou cestou je translokace aktivované JNK kinázy do jádra, kde nastává fosforylace c-Jun na Ser63/73 a Thr91/93 (Win p. *et al*, 2018). Následná dimerizace Jun proteinů (JunB, JunD, c-Jun) a proteinů Fos (FosB, Fra-1, c-Fos, FR-A-2) umožní tvorbu transkripčního faktoru AP-1 (*Activator protein-1*; Aktivátor protein-1). Hlavní funkcí AP-1 je transkripce pro-apoptotických proteinů, jako je například TNF α , Fas-L nebo Bak. Naopak c-Jun může aktivovat i anti-apoptotickou dráhu v podobě degradace sebe samotného. Mechanismus spočívá ve fosforylaci c-Jun na Thr239, což umožní navázání Fbw7 rozpoznávací složky substrátu (*F-box and WD repeat domain-containing 7*) E3-ligázy iniciující destrukci c-Jun (Higgings P. J., 2010).

Jako další substráty může JNK fosforylovat JunD, ATF2/3 (*Activating transcription factor 2/3*; Aktivační transkripční faktor 2/3), Elk1, Elk-3, RXRa, RAR α , AR, NFAT nebo c-Myc (Seki E. *et al*, 2012). Transkripční faktor c-Myc slouží jako proto-onkogen a v nízkých koncentracích se nachází v buňkách fyziologicky. Jakmile je stabilizace faktoru v závislosti na signálních podnětech narušena, exprese c-Myc se zvýší, což může signalizovat tvorbu nádoru. Hladina c-Myc se proto kontroluje. Mechanismus působení je regulován 3 molekulami, mezi které patří SCF (*SkpCullin-F-box*), Fbw7 a E3 ubikvitin ligázou. Pokud jsou tyto kontrolní molekuly ohroženy, nastává dysregulace c-Myc a tvorba nádorů (Mei Y., Wu M., 2016).

Alternativním mechanismem působení aktivované JNK je přímá fosforylace rodiny p53 proteinů na Thr81 JNK kinázou. Proteiny p53 jsou kódované genem

TP53, který se nazývá tumor supresorový gen. Hlavní funkcí je zábrana vzniku nádorů, regulace buněčného cyklu, regulace apoptózy či oprava DNA. Významnost je dána tím, že protein p53 je inaktivována ve více než u poloviny všech lidských rakovin.



Obr. 4: Mechanismy působení aktivované JNK kinázy.

(převzato a upraveno z Dhanasekaran D. N., Reddy P. E., 2017); zkratky: JNK (c-Jun NH₂ terminální kináza), Bax (Bcl2-asociovaný X protein), Bid (BH3-interagující doména smrti). Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), TRAF 2 (TNF receptorem asociovaný faktor 2). Casp-3,-7,-8,-9 (Kaspáza-3,-7,-8,-9). Apaf-1 (Aktivační faktor 1 pro apoptickou proteázu), ATF2 (Aktivační transkripční faktor 2), AP-1 (Aktivátor protein-1), Fas-L (Fas-ligand), TNF- α (Tumor nekrotizující faktor- α).

Přímou fosforylaci proteinu p53 mohou zprostředkovat kinázy CHK1/2 (Checkpoint kinase-1/2), ATM (Ataxia telangiectasia mutated), ATR (ATM and RAD3-related) aktivované vlivem genotoxického stresu (Westermarck J., 2010). Fosforylace JNK kinázou probíhá na Ser6, tím dochází k inhibici vazby ubikvitinu ligázy na protein p53 a stabilizaci jeho hladiny. Vazba ubikvitinu ligázy na protein p53 za normálních okolností reaguje na poškozené DNA a spouští degradaci vzniklého

komplexu. Nejznámějším negativním regulátorem je *Mouse double minute 2 homolog*. Bylo dokázáno, že exprese FDH (10- formyltetrahydrofolát dehydrogenáza) je u nádorových onemocnění snižena a jeho hladina reguluje p53-závislou apoptózu. Dále protein p53 indukuje exprese dalších pro-apoptotických genů jako je Bax (*Bcl2-associated X protein*; Bcl2-asociovaný X protein) a PUMA (*p53 up-regulated modulator of apoptosis*; *p53-up regulační modulátor apoptózy*), NOXA, letální receptor CD95. Další možnou cestou aktivace procesu apoptózy je uvolnění cytochromu c z mitochondrií, v důsledku oligomerizace Bax po uvolnění vazby p53 z Bcl-X_L (Dhanasekaran D. N., Reddy P. E., 2017; Mei Y., Wu M., 2016).

Mimo fosforylace proteinu p53 může JNK kináza fosforylovat proteinu p73, který je strukturální a funkční homolog proteinu p53 patřící do rodiny p53. Na rozdíl od proteinu p53 má protein p73 navíc doménu na C-konci, která chrání protein před ubikvitinací a má obecně 7 potenciálních fosforylačních míst, ale jen 3 z nich vyskytující se u lidí. Oba proteiny mají podobné funkce. Iniciaci apoptózy zprostředkovává protein p73 transaktivací pro-apoptotických genů p73 nebo pomocí mechanismu s cisplatinou. Mezi odlišné geny patří GRAMD4 gen, apoptin, ostatní jsou stejné jako u p53. Mitochondriální translokaci a oligomerizaci Bax umožňuje GRAMD4, a to pouze u proteinu p73. Apoptin indukuje apoptózu selektivně v rakovinných buňkách. Podporujícími molekulami jsou v tomto případě BH3 protein PUMA a prsteník domény E3 ubikvitin RIP2 (Yoon Mi-K. *et al*, 2015).

Podněty spouštějící vnitřní dráhu apoptózy aktivují pro-apoptotické proteiny Bax nebo Bak pomocí BH3 proteinu. Aktivované Bax/Bak umožní vnější mitochondriální membránovou permeabilizaci. Principem je translokace Bax/Bak do mitochondrie díky fosforylaci 14-3-3 α proteinu, která způsobuje disociaci Bax/Bak a požadovanou translokaci, která stimuluje uvolnění především cytochromu C z intramembránového prostoru. Cytochrom c společně s Apaf-1 a kaspázou-9 tvoří apoptozóm, který aktivuje kaspázu-3 a kaspázu-7 indukující apoptózu. Další apoptotický účinek podporuje fosforylace na Ser128 v proteinu Bad. Pokud apoptotické stimuly nejsou, je Bad fosforylován na Ser112/138/155 a vázán 14-3-3 proteinem do neaktivního komplexu. Apoptózu v této dráze podporuje ještě fosforylace proteinu 14-3-3 Ser184, což podpoří uvolnění Bad z vazby. Vliv UV záření způsobuje fosforylaci Bim a BMF, která uvolní vazby komplexu Bim- Dynein a BMF-Myosin V. Oba mohou aktivovat Bax/Bak, nebo naopak vázat, a tím inhibovat anti-apoptotické faktory Bcl-2. Fosforylace Bcl-2 na Ser70 může být zprostředkovaná

přímo JNK kinázou. Apoptóza vyvolaná TNF- α receptorem způsobuje štěpení Bid a fragment o velikosti 21kDa se přemístí do mitochondrie. Přemístění podporuje uvolnění SMAC/DIABLO proteinů a OMI mitochondriálních proteinů, které způsobují inhibici anti-apoptického proteinu XIAP a cIAP1 protein, které inhibují kaspázu-8, což způsobí aktivaci kaspázy-3 a kaspázy-7 vedoucí k apoptóze.

Tubulární substrát *Doublecortin-X* má schopnost vázat JNK kinázu přímo. Většina fosforylačních míst se nachází na N-konci, C-konec vážem *Doublecortin like-kinase 1/2*, které umožňují zesílení neuspořádaného C-konce. Dalším proteinem je *WD repeat-containing protein 62*, který má na svém C-terminálním laloku 6 vazebných míst pro fosforylaci JNK kináz/MKK7 domén a na N-terminální laloku WD40. Dle studií se tento protein podílí na normálním vývoji neurálních progenitorových buněk.

2.4.1. Scaffold proteiny

Aktivace JNK kináz může být uskutečněna i prostřednictvím *scaffold* proteinů, které usnadňují interakci protein-protein v případě, že komplexy postrádají vnitřní enzymovou aktivitu (Obr. 5). Mezi nejvýznamnější proteiny, které mají schopnost vázat přímo JNK nebo jeho aktivátory, patří JIP 1, JIP 3, SAB, POSH, GRASP 1, KSR1/KSR2.

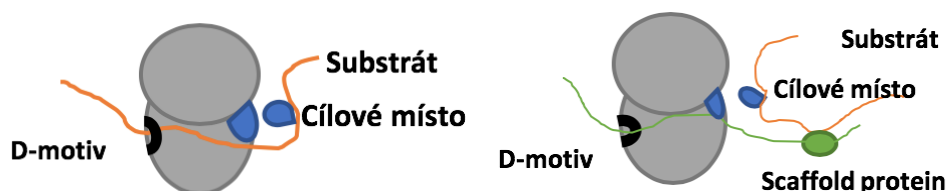
Nejdůležitějším *scaffold* proteinem je JIP 1 (*JNK-interacting protein1*, JNK-interagující protein1), protože může vázat MLK, DLK i MKK7. Působením JIP 1 vytváří silnou pozitivní zpětnou vazbu. Struktura C-terminální laloku obsahuje tři složené domény. První doménou je *Phosphotyrosine-binding, or protein tail-binding*, která je důležitá pro vázání nákladu nevyžadující fosforylaci. Další doménou je SH3 doména (*Src homology 3*), která umožňuje dimerizaci JIP1 a poslední doménou je JNK vázající doména obsahující jedno ze dvou cílových míst fosforylace S421. Posledních 10 AMK tvoří kinesin lehký řetězec vázající lineární motiv, pomocí kterého je transportován proteinový komplex. Důležitou doménou je N-terminální neuspořádaný lalok, který je přímo fosforylován D-motivem JNK kináz a umožňuje odpojení proteinového komplexu. Na tomto laloku se též nachází druhé cílové místo fosforylace na Thr103 (Zeke A. *et al*, 2016; Win p. *et al*, 2018; Yasuda J. *et al*, 1999).

Dříve známý JLP, dnes nazývaný JIP3 tvoří samostatnou skupinu regulujících proteinů, které se vážou na ASK1 a regulují ASK závislou signální dráhy, ale

nemůžou přímo aktivovat JNK kinázu. Tento protein je typický pouze pro JNK signalizační kaskádu (Zeke A. *et al*, 2016; Win p. *et al*, 2018).

Scaffold protein POSH (*Plenty of SH3*) se váže na protein Rac-1, MLK3 a zvyšuje aktivitu JNK kinázy v této signální dráze. Komplex MEKK1 interaguje s *General receptor for phosphoinositides 1-associated scaffold protein* a umožňuje silnou aktivaci JNK kinázy. Tento protein se účastní pouze JNK signální dráhy (Xu D. *et al*, 2014).

Mitochondriální Scaffold protein se nazývá SAB. Nachází se na vnější straně mitochondriální membrány. Jeho struktura obsahuje N-terminální SH3 doménu, jakožto vazebné místo nacházející se uvnitř mezi membránového prostoru, a doménu se 2 D- motivy na C-konci směřující do cytoplazmy. Tento protein je nezbytný pro translokaci JNK kinázy do mitochondrií, jeho vyčerpáním přemístění není možné (Win p. *et al*, 2018).



Obr. 5: Schématické znázornění působení Scaffold proteinů při aktivaci JNK kináz.

2.5. Regulace JNK signálních drah

Fyziologický průběh signálních drah JNK kinázy je závislý na době trvání aktivace JNK kináz i rozsahu aktivace. Obecně p38, p53, SIRT2, P300, NF- κ B, GADD45 β a SAB modulují aktivitu JNK kinázy. Celý mechanismus je proto vnitřně řízen zpětnovazebně a pomocí regulačních molekul. Důležitou úlohu mají fosfatázy. Aktivita JNK se může snížit odštěpením fosfátu z motivu Thr-Pro-Tyr potřebného pro aktivaci smyčky různými Ser/Thr fosfatázami, Tyr fosfatázami nebo rodinou MKPs (*Mitogen-activated protein Kinase Phosphatases*; Mitogenem aktivované proteinové kinázy fosfatázy) (Liu X. *et al*, 2016).

Rodina regulačních fosfatáz patří do skupiny DUSPs (*Dual-specificity phosphatases*; Duální-specifické fosfatázy). Název DUSPs je odvozen od schopnosti defosforylovat fosfotyrosin i fosfoserin/threoninové zbytky a ze schopnosti odstranit fosfát z více substrátů současně. Rodina zahrnuje celkem 10 fosfatáz nacházející se

v cytoplasmě (DUSP₁, DUSP₄), v jádře (DUSP₁₀, DUSP₁₆, DUSP₈) nebo v cytoplasmě a současně i v jádře (Zeke A. *et al*, 2016). Významným členem je DUSP₁, který reaguje na signální vyvolané růstovými faktory a stresem, hlavním negativním regulátorem TLR signalizace bránící vzniku nadměrnému zánětu. Člen, který se nachází jak v cytoplasmě, tak v jádře se nazývá DUSP₅ a jeho hlavním cílem je AP-1 transkripční faktor. V neposlední řadě DUSP₁₆, který se váže na JIP-1 protein a jeho využití je při léčbě po ozáření UV světlem. Má schopnost se vázat přímo na JNK kinázu, vazba ale není tak pevná, proto se váže na tento Scaffold protein, kterým plně snižuje aktivitu JNK kináz (Huang G. *et al*, 2009).

Na přímé regulaci JNK kináz se podílí acetylace a deacetylace. Mezi cíle deacetylace patří SIRT2 (*Sirtuin 2*) jsou protein p53, tubulin a lysin 16, čímž dochází k inhibici jejich aktivity. Toto je tedy důležité pro protinádorovou léčbu. Deacetylace proteinu p53 prostřednictvím SIRT2/1 aktivuje JNK kinázu. Aktivace SIRT2 nastává při zvýšeném množství NAD⁺, které je například v granulocytovém stimulujícím faktoru. Problémem je, že oba sirtuiny se nepodílejí příliš významně na mechanismu aktivace smyčky, nejsou tedy rozhodující v apoptóze. Naopak acetylace proteinu p53 pomocí P300 proteinu inhibuje JNK kinázu. Tento protein je kódován p300 genem a funguje jako histon acetyltransferáza regulující transkripci genů prostřednictvím remodelace chromatinu (Win p. *et al*, 2018; Hoffmann G. *et al*, 2014).

Dle studií byl zjištěn další regulátor ASK1 komplexu nazývaný CARD6 (*Caspase recruitment domain family, member 6*), který se váže na ASK1 a snižuje jeho schopnost fosforylovat po proudu JNK. Studie byla provedena na jaterním modelu, kde se aktivoval ASK1 a TAK1. Deficit CARD6 zvyšuje expresi ASK1, deficit naopak snižuje. Na TAK1 komplex CARD6 nemá žádný vliv (Win p. *et al*, 2018).

Většina cílových substrátů k fosforylaci má podobu neuspořádaných cílových segmentů a cílová místa jsou uložena uvnitř smyček, které vyčnívají ze segmentů. Fosforylace tedy nemění konformaci cílových substrátů, ale pouze ovlivňuje vazby protein-protein. Rozpoznáváním pro fosforylaci je shoda uvolněného cílového místa s lineárními motivy, kterým se říká fosfo-přepínače. Fosfo-přepínače existují pozitivní a negativní. Negativní fosfo-přepínače inhibují interakci z důvodu nekompatibilního motivu způsobeného elektrostatickými změnami, intrařetězovým soutěžením s neodpovídající tvorbou nebo eliminací solných můstků. Příkladem je fosforylace DLC Bim přepínačem. Pozitivní-fosfopřepínače podporují tvorbu nových protein-protein interakcí a příkladem je přepínač působící na ELK1 (*ETS Like-1 protein*),

protože postrádá klasický transaktivační motivy umožňující interakci s P300. Fosforylace ETS transkripčního faktoru ELK1 JNK1 kinázou umožní tvorbu nového lineárního motivu, který se následně váže na P300 prostřednictvím zinkového prstu a umožní tvorbu chromatin modifikujících enzymů (Zeke A. *et al*, 2016).

3. Fyziologie a patologie JNK signálních drah

V závislosti na výskytu příslušných izoform JNK kináz se projevuje jejich úloha v celkovém fungování lidského těla. Dle studií je dokázáno, že JNK kinázy se podílí na embryogenezi. Konkrétně se účastní zavření nervové trubice a správné trajektorie vývoje a růstu axonů. Bylo dokázáno, že delecí buď JNK1 nebo JNK2 kinázy nastává vývoj mozku mimo lebku. Ve vývoji nervového systému je regulace umožněna díky impulsům netrinů a semaforinů, na které reaguje JNK kináza. Další klíčovou molekulou ve vývoji axonů v mozku je MKK7 a MKK4 se naopak uplatňuje při regeneraci jater. Delece MKK4/MKK7 způsobuje těžké vývojové zpomalení nebo až embryonální letalitu. Další oblastí je morfologie srdce a ledvinového epitelu, kde je klíčový Wnt-11 a ve vývoji hipokampálních neuronů je důležitý Wnt-7b (Kuan C. Y. *et al*, 1999).

Mimo embryogenezi JNK kináza reguluje neurální funkce u dospělých jedinců. Exprese JNK3 kinázy v mozku reguluje vývoj a regeneraci neuronů, nadměrná aktivita však způsobuje apoptózu neuronů, což je nežádoucí. Z toho důvodu je JNK kináza navržena na zmírnění mrtvice, epilepsie a neurodegenerativních onemocnění. V souvislosti s dědičným postižením intelektu byla dokázána souvislost s mutací genu JNK3. Dále je JNK kináza nezbytná pro erytropoetin-zprostředkované přežití buněk mechanismem inaktivace Bcl proteinu (Wu Q. *et al*, 2019).

Role JNK kináz v imunitním systému je reakce na antibakteriální, antivirové i antiparazitární signály, vývoj T buněk a kontrola vrozené imunity. Vrozená imunita je prvním obranným mechanismem při infekci a její hlavní úlohou je rozpoznat patogen pomocí receptorů, hlavně Toll nebo NOD rozpoznávající mikrobiální složky. Následuje aktivace NF- κ B v makrofázích a dendritických buňkách. Proapoptickou funkci inhibuje NF- κ B, což je klíčové pro řadu fyziologických procesů (přežití buněk během zánětu, regenerace jater) (Arthur J. S., Ley S. C., 2013).

Patologie signálních drah JNK kináz je spojena s jejich různorodou funkcí. Mezi časté onemocnění spojené s patologií JNK signálních drah patří nádorové

buněčné linie, diabetes, neurodegenerativní choroby nebo obezita. V rámci léčby probíhá neustálý výzkum inhibitorů důležitých molekul patologických mechanismů, které ale nejsou vždy žádoucí vzhledem k ostatním fyziologickým mechanismům, kterých se účastní (Bubici C., Papa S., 2014).

3.1. Alzheimerova choroba

Mezi nejčastější neurodegenerativní onemocnění, kterého se JNK signální dráha účastí je Alzheimerova choroba. Nemoc je spojena se ztrátou kognitivních funkcí, v důsledku tvorby perineuronálních neuritických plaků a postupnou eliminací neuronů. Klíčovou molekulou je v tomto mechanismu ASK1. Tvorba senilních plaků je důsledkem hromadění β -amyloidu, který vzniká štěpením amyloidního prekurzorového proteinu, který se podílí na tvorbě buněčné membrány (Origlia N. *et al*, 2009). Štěpení indikuje tvorbu ROS, které aktivují ASK1, a tím JNK signální dráhu. Důsledkem je hyperfosforylace Tau proteinu, která způsobuje tvorbu nerozpustných párových šroubovic ukládaných v mozku. Fyziologickým působením Tau proteinu je vazba na mikrotubuly v neuronech, jejich stabilizace a umožnění snazší polymerace. Hyperfosforylace však tento mechanismus inaktivuje. Vzniklé šroubovice jsou také součástí senilních plaků a obklopují β -amyloid (Whittington R. A. *et al*, 2013). Eliminace neuronů je způsobena apoptózou JNK dráhy reagující na nadměrnou tvorbu ROS, které doprovází celý patologický mechanismus. Podnětem může být ER stres, který dle studií je častější u buněk vykazující mutace presenilinu-1 v ER. Další důležitým mechanismem je přenos signálu insulínu, který se podílí na kognitivních funkcích mozku. Dle studií vazba insulínu vede k autofosforylaci tyrosinových zbytků substrátu insulínu 1, který reguluje učení a paměť. Zhoršení fosforylace vede k rezistenci na insulin. Jedním takovým podnětem může být TNF- α aktivující JNK signální dráhu, která způsobí fosforylaci serinových zbytků substrátu insulínu 1, a tím insulinovou rezistenci. V tomto onemocnění se tedy nabízí možný terapeutický cíl v podobě inhibice ASK1 molekuly (Song J. *et al*, 2014; Kim E. K., Choi Eui-Ju, 2010).

3.2. Obezita

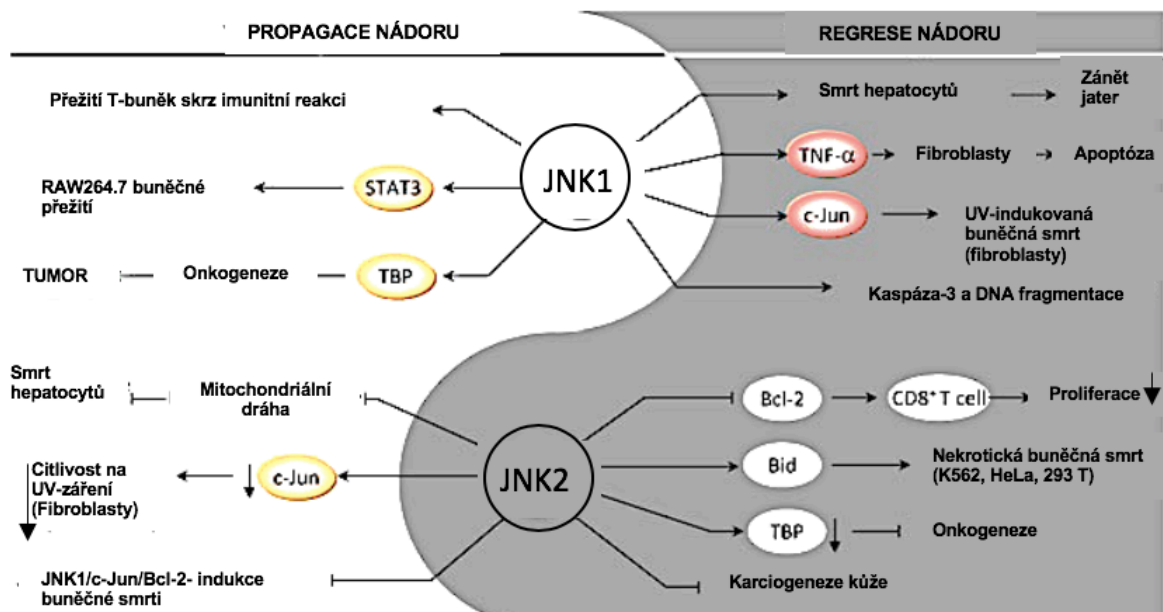
V dnešní době je obezita způsobená konzumací tučného jídla velmi častým problémem a je doprovázená zhoršeným metabolismem glukózy, insulinovou resistencí a způsobuje řadu komplikací vedoucí k steatóze jater nebo diabetu mellitu 2. typu. Dle nedávných studií bylo dokázáno, že JNK dráha se účastní souvisejících signalizací v makrofázích, játrech a buňkách přední hypofýzy, ve kterých hraje důležitou roli (Han S. M. *et al*, 2012). Signální kaskáda JNK kináz je iniciována zvýšenou hladinou TNF- α a mastných kyselin vlivem rostoucí tukové tkáně. Na obezitu reagují makrofágy, které se podílí na tvorbě zánětu. Role JNK kináz v makrofázích je aktivovat c-Jun, ATF2 nebo ELK-1, které aktivují polarizaci M1 makrofágy spouštějící syntézu zánětlivých cytokinů IL-6, TNF- α , IL-1 β . Zánětlivé cytokiny narušují metabolismus glukózy tím, že inhibují insulin- receptorový substrát 1 klíčový v insulinové signální kaskádě, a tím způsobují insulinovou rezistenci (Solinas G., Becattini B., 2017).

Na tvorbu zánětu reagují játra, která zvyšují ukládání lipidů, čímž potlačují produkci glukózy v játrech. Projevem je hyperglykémie nalačno. Dle nedávné studie jaterní rezistence je však tato skutečnost zpochybněna a bylo dokázáno, že hyperglykémie není způsobena snížením účinku insulinu v játrech. Příčinou je neschopnost insulinu potlačit lipolýzu v tukové tkáni, která zvyšuje uvolňování glycerolu (substrátu pro glukoneogenezi) vedoucí k hyperglykémii (Perry J. R. *et al*, 2015). Dále bylo zjištěno, že JNK kinázy nepřímo regulují expresi jaderného receptorový korepresoru 1, který omezuje expresi cílových genů snižující oxidativní metabolismus jater. Výsledkem je tedy jaterní steatóza a patologie jaterního insulinu. Naopak inhibice JNK kináz poškození snižuje, je však zatím nemožné provést inhibici JNK1 a JNK2 pouze v hepatocytech bez ovlivnění nehepatálních buněk (Pal M., Febbraio M. A., Lancaster I. G., 2016).

Kosterní svalovina kontroluje metabolismus glukózy v celém těle a oproti ostatním tkáním je odolná vůči zánětlivým účinkům obezity a ve většině případů ji obezita nemění. Potenciálním problémem je však aktivace JNK kináz za těchto podmínek. Studie však nepodaly jednotné výsledky, zatím se tedy aktivace JNK kináz obezitou v kosterní svalovině nepovažuje za závažný problém (Sabio G. *et al*, 2010; Pal M. *et al*, 2013).

Další oblastí, která reaguje na obezitu je osa hypothalamus-hypofýza-štítná žláza. Podnětem je obezitou aktivovaná JNK kináza v přední hypofýze spouštějící produkci AP1 transkripčních genů zvyšující expresi AP1 genu. Ten iniciuje tvorbu jodothyronindeiodinázu typu 2, jeho zvýšená hladina zvyšuje zpětnou vazbu regulace produkce hormonu stimulující štítnou žlázu, který snižuje tvorbu hormonů štítné žlázy. Následkem je zvýšení energetického metabolismu a rozvoj obezity (Pal M., Febbraio M. A., Lancaster I. G., 2016).

Další oblastí, která silně souvisí s insulinovou rezistencí jsou β -buňky pankreatu. Bylo dokázáno, že trvalá aktivace JNK smyčky vede ke snížené produkci insulinu β -buňkami. Pokud inhibujeme JNK3, která je zde exprimovaná, nastane opačná situace než při blokování JNK1 a JNK2. Dle studií totiž blokáce JNK3 zvyšuje citlivost na apoptózu vyvolanou cytokiny. Reakce β -buněk na JNK kinázu však není jednoznačně ověřená, neustále probíhá výzkum (Solinas G., Becattini B., 2017).



Obr. 6: „Yin a Yang“ vlastnosti JNK1 a JNK2 vzhledem k propagaci a regresi nádoru. (převzato a upraveno z Wu Q. et al, 2019); zkratky: STAT3 (Převodník signálu a aktivátor transkripce 3), TBP (TATA-box vázající protein), TNF- α (Tumor nekrotizující faktor α), Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), Bid (BH3-interagující doména smrti).

3.3. Nádorové buněčné linie

V nádorových buněčných liniích má JNK proliferační i inhibiční účinky, čehož se využívá v léčbě. Dle studií na myších fibroblastech a lidských buňkách (K562, HeLa, 293 T) bylo dokázáno, že JNK1 a JNK2 má „Yin a Yang“ vlastnosti neboli opačné funkce ve vývoji nádoru a přežití buněk. Jako příklad můžeme uvést reakci

T lymfocytů v průběhu virové infekce. Podporu přežití aktivovaných T-buněk v imunitní odpovědi umožňuje JNK1 kináza a expanzi CD8⁺ T buněk JNK2 (Wu Q. *et al*, 2014).

Další rozdílnost je ve vlivu na protein p53. Pozitivní regulace proteinu p53 je zprostředkována JNK2 kinázou a negativní kontrola JNK1 kinázou (Obr. 6). Ve fibroblastech iniciuje apoptózu JNK1 kináza, JNK2 ji inhibuje (Pietkiewicz S. *et al*, 2013). V lidských buňkách hepatomu TATA-box vázající protein upreguluje JNK1 kináza podporující onkogenezi, naopak JNK2 kináza snižuje expresi TATA-box vázajícího proteinu, a tím i potlačuje onkogenezi (Ganz D., Donin N., Fishelson Z., 2009).

Rakovina jater je příklad účasti JNK kináz v iniciaci a progresi karcinomu. Nejběžnějším typem je hepatocelulární karcinom, u kterého je JNK kináza posuzována jako potencionální terapeutický cíl při léčbě (Wang J., Tai G., 2016). Delece I κ B kinázy β indukuje apoptózu JNK podporující tvorbu nádoru, protože spouští mechanismus přežití hepatocytů. V tomto případě působí JNK1 jako nádorový promotor, protože při jeho odstranění bylo dokázáno, že účinek delece I κ B kinázy β je inhibován, a tudíž nastává inhibice progresu karcinomu. Dále bylo dokázáno, že JNK1 kináza přímo reguluje proliferaci hepatocytů prostřednictvím transkripčního promotoru c-Myc, který řídí gen p21. S rostoucí velikostí nádoru roste aktivita JNK1 kinázy a rostou také geny řídící buněčný cyklus a proliferaci (Bubici C., Papa S., 2014).

Další nádor, který JNK kinázy podporují je mozkový nádor, nejčastěji gliom. Nejdůležitější typ se nazývá glioblast a bylo dokázáno, že jeho přítomnost je vázána na zvýšené hladiny JNK kináz. Typ JNK kinázy, která v tomto hraje nejdůležitější roli, je JNK2 kináza a bylo dokázáno, že podporuje tumorigenezi aktivací Akt a up-regulací exprese eukaryotického translačního iniciačního faktoru 4. Při vývoji plicního nádoru JNK také podporuje progresi nádoru Ras dráhou způsobené mutací genu KRas (Cellurale C. *et al*, 2011). Naopak karcinom prsu je případ, kdy JNK kinázy inhibují tvorbu karcinomu. Častým případem rakoviny prsu je mutace MEKK1 a bylo dokázáno, že JNK1 i JNK2 kinázy mají inhibiční účinky růstu nádoru. Mechanismem snížení oprav DNA, proteinů a aktivací proteinu p21 (Cellulare C. *et al*, 2012).

Všeobecně u léčby nádorů se úmyslně indukuje apoptóza, aby eliminovala nádorové buňky. Metoda využívaná nejčastěji se nazývá chemoterapie, u které je

velkým problémem mnohočetná léková rezistence vedoucí k úmrtnosti pacientů. Dle studií bylo dokázáno, že JNK kináza je nedílnou součástí chemorezistence. Důkazem je rakovina kmenových buněk pankreatu, které detekujeme vysoké hladiny JNK kináz, které způsobují rezistenci na 5-fluorouracil a gemcitabin, příčinou je inhibice ROS. Pokud však inhibujeme JNK kinázu, ihned nastává produkce ROS 5-fluorouracilem a gemcitabinem, a tím podpora apoptózy. Příčinou je schopnost JNK kináz přepínat mezi apoptózou a autofagií (Wu Q. *et al*, 2019).

Tab. II: Funkce přežívání buněk rakoviny JNK dle studie *in vivo* a *in vitro*.
(převzato a upraveno z Wu Q.*et al*, 2019).

| Buňky | Léčba | Test | Výsledky |
|--------------------------------|-----------------------|--|--|
| Fibroblasty | Barveno Hoechst | SP600125 | TNF- α indukovaná apoptóza potlačena inhibicí JNK. Absence NF- κ B přispívá k TNF- α indukované apoptóze. |
| Hematopoetické pro-B FL5.12 | IL-3 | SP600125 | JNK je třeba pro IL-3 přežití buněk (potlačení apoptózy) díky fosforylaci a inaktivaci BAD |
| B-lymfom | — | SP600125 malé interferující RNA | JNK (c-Myc, Egr-1) jsou nutné pro přežití a růst B-Lymfomu |
| Makrofág | Růstový faktor, CSF-1 | SP600125 | Inhibice JNK vede k inhibici buněčného cyklu a k následné apoptóze, JNK je tedy nezbytná pro vývoj a přežití makrofágů |
| T buňky | LL-Z1640-2 | SP600125 | TA K1-JNK umožňuje přežití buněk stabilizací Mcl1IL-2R v aktivovaných T-buňkách |
| Akutní myeloidní leukémie | HO-1 | SP600125 | HO-1 potlačuje apoptózu buněk prostřednictvím aktivace JNK/c-Jun dráhy, proto je HO-1 potencionální cíl pro léčbu. |
| Melanocyty | UV záření | SP600125 | Endothelin-1 zvyšuje fosforylaci JNK a snižuje genotoxické účinky UV záření |
| β -buňka slinivky břišní | Tyrosol | — | Tyrosol inhibuje tunicamycin-indukovanou smrt díky fosforylaci JNK kináz. |
| Osteoklasty | RANKL deprivace | SP600125 | JNK brání osteoklastům před apoptózou vlivem RANKL |
| Buňky plicní tepny endotelu | Kyselina EET | SP600125 JNK1/2 siRNA | EET podporuje JNK a c-Jun, což podporuje proliferaci buněk, angiogenezi |

Autofagie je zodpovědná za přežití buněk při rakovině a uplatňuje se u ER stresu, ontologického vývoje, mikrobiální infekci nebo při onemocněních spojených s hromaděním proteinových agregátů.

JNK kináza reguluje tento mechanismus prostřednictvím FoxO-závislých transkripčních s autofagií příbuzných genů, které jsou regulovány *insuline-like growth factorem-1* a TNF- α (Zhou Y. Y. *et al*, 2015). Důležitou molekulou je Bcl-2, který aktivuje autofagii. Komplex Bcl-2- beclin 1 vytvořený rychlou fosforylací Bcl-2 nejprve aktivuje autofagii a pokud ji buňka už není schopná, fosforylací Bcl-2 nastává inaktivace jeho apoptotických funkcí (Kim Y. J. *et al*, 2015). Dalšími chemorezistentními mechanismy řízený JNK je aktivace převodníku signálu a aktivátoru transkripce 3, který opravuje chemoterapií poškozenou DNA, čímž účinnost chemoterapie inhibuje.

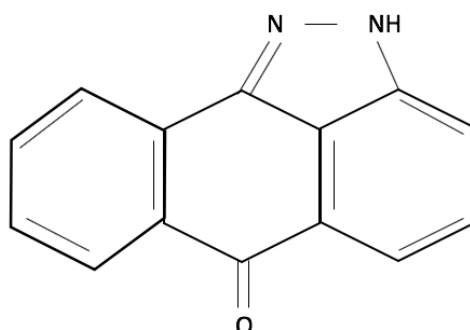
Prostředí tumoru je schopno chránit nádorové buňky před imunitní destrukcí JNK regulací exprese TGF- β a INF- γ , tumor imunosupresivních cytokinů, tzv. imunitní úniky. Další ochranu poskytuje methylguanin DNA methyltransferáza, prothymosin- α a v neposlední řadě lze indukovat odčerpání léčebného cytostatika z buňky aktivací nespecifické pumpy v buněčné membráně ATP-vázající kazeta super-rodiny G člen 2 (Yang X.-j. *et al*, 2013; Wu Q. *et al*, 2019).

3.4. Inhibitory JNK

Jak bylo zmíněno, JNK kinázy hrají klíčovou roli v patologiích mnoha typů rakovin a z toho důvodu probíhá syntéza selektivních inhibitorů JNK kináz. Základní kategorie tvoří inhibitory kompetitivní pro ATP a inhibitory nekompetitivní pro ATP. Z důvodu odlišných funkcí JNK1, JNK2 a JNK3 je nutné pro klinické účely používat inhibitory selektivní, které zatím nejsou komerčně dostupné pro pacienty, ale pouze pro výzkumné účely s čistotou vždy větší než 98 %. Důležité je v této léčbě udržet rovnováhu mezi požadovanými inhibovanými izoformami JNK kináz a mezi fyziologickým výskytem daných JNK izoform. Závažným problémem ATP-kompetitivních inhibitorů je nedostatečná specifita a snižování účinku vzhledem ke koncentraci ATP. Potencionálnějším prostředkem budoucnosti jsou ATP-nekompetitivní inhibitory (Bubici C., Papa S., 2014).

Více prostudované jsou inhibitory kompetitivní pro ATP zahrnující malé molekuly různých struktur (indazoly, aminopyrazoly, aminopyrimidiny, benzothiazol-

2-yllové acetonitrily). Působení je fokusované na vysoce konzervativní ATP vázající místo, vykazují tedy nízkou kinázovou specifitu. Jedním z nejstarších inhibitorů je SP600125 působící proti všem izoformám JNK kináz (Obr. 7). Mechanismus působení spočívá v zastavení G2/M fáze buněčného cyklu zvýšenou expresí proteinu p21, Cdk2 a fosforylací histonu H3 nebo indukci apoptózy. Protein p21 působí mechanismem potlačení proteinů kontrolující mitózu po 24 h působení. Po 48 h působení negativní Cdk2 inhibuje endoreduplikaci inhibicí interakce Cdk2 s cyklinem E a fosforylace Ser10 histonu H3. Po inhibici 72 h SP600125 snižuje expresi Bcl-2 a štěpí poly (ADP-ribóza) polymerázu aktivující apoptózu (Tab II.). Testování tohoto inhibitoru bylo úspěšné na myším modelu Parkinsonovy choroby nebo na modelu leukemických buněk. Dále byla provedena studie onemocnění respiračního traktu, charakterizované progresivním difuzním oboustranným plicním edémem a zánětem způsobující úmrtnost u 40-50 % pacientů. Studie byla úspěšná in vivo i in vitro, SP600125 zmírňuje onemocnění a zvyšuje expresi claudinu-4, který je nezbytný pro clearance alveolární tekutiny v plicích (Zheng Y. *et al*, 2014; Moon D. O. *et al*, 2009). Dalším inhibitorem je AS601245, benzothiazolon, inhibující fosforylaci c-Jun. Testování proběhlo na potkanech s fokální cerebrální ischemií. V nedávné době byl vyvinut ireverzibilní inhibitor JNK-IN-8 tvořící kovalentní vazbu s konzervovaným cysteinem v místě ATP vazby. Jeho hlavní předností je schopnost řídit selektivitu kinázy a schopnost prodloužit farmakodynamiku (Zhang T. *et al*, 2012).



Obr. 7: Struktura nejznámějšího inhibitoru JNK kináz SP600125, $C_{14}H_8N_2O$, Pyrazolanthron.

Druhou kategorií jsou inhibitory nekompetitivních s ATP zabraňující interakcím protein-protein JNK s JIP1 nebo ostatními kinázami následných substrátů. Inhibitor D- JNKI-1 inhibuje vazbu s JIP1 testovaných na myších s hepatocelulárním

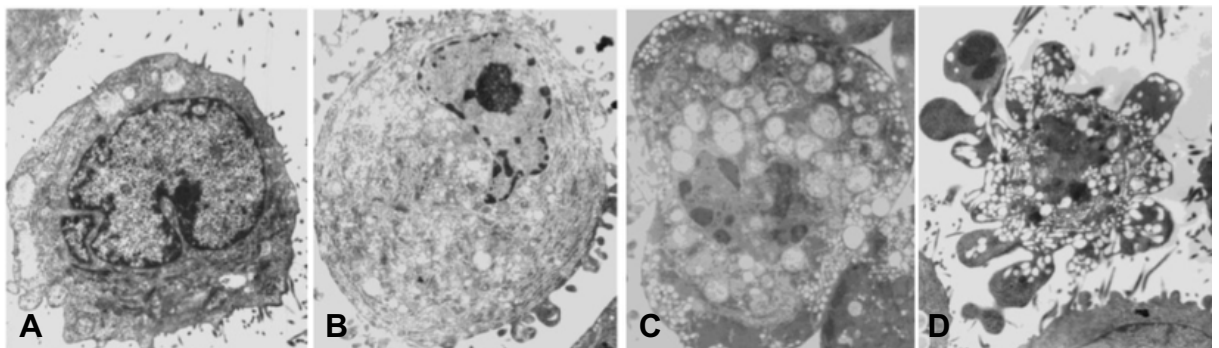
karcinomem a zánětlivým střevním onemocněním působící ještě 3 měsíce po aplikaci. Další inhibitor BI-78D3 blokuje poškození jater a obnovuje citlivost na insulin u diabetu 2. typu. Dle studií byla vyvinuta nová látka duální povahy, interagující jak s ATP místem, tak s proteiny, thiazol-2,2'-diaminová sloučenina, JD123 (Ngoei R. W. *et al*, 2013).

4. DALŠÍ DRUHY BUNĚČNÉ SMRTI

Buňky zanikají různými mechanismy. Apoptóza se řadí mezi regulované buněčné smrti, existuje ale i řada neregulovatelných a nefyziologických zániků.

4.1. Morfologické znaky apoptózy

Průběh apoptózy doprovází charakteristické morfologické změny. Mezi rané znaky patří zmenšování buňky, zhuštění cytoplazmy, v konečné fázi dochází k pyknóze jádra, která je způsobená kondenzací chromatinu. Následuje rozpad jádra (karyorhýza), vyvolaná nerovnoměrným uvolňováním chromatinu skrz cytoplazmatickou membránu (Obr. 8). Dále dochází k rozpadu buňky na malá Apoptotická tělíska (ApoBDs), které jsou dále degradovány buňkam rozpadu okolními nebo imunitního systému. Karyorhýza je umožněna biochemickými změnami, mezi které patří odhalení fosfatidyl-1-serinu na povrchu plazmatické membrány (Chen Q. *et al*, 2018). Apoptóza na rozdíl od nekrózy nezpůsobuje zánět, protože zánětlivé buněčné složky nejsou uvolňovány. Fagocytace jádra nastává rychle a nedochází k tvorbě zánětlivých cytosin.



Obr. 8: Morfologické změny v průběhu apoptózy. (převzato a upraveno z Dai J.-Z. *et al*, 2012).

4.1.1. Detekce apoptózy

Metody detekující apoptózu v kultivovaných buněčných liniích lze rozdělit na fixační (TUNEL), lyzační (imunoblot, PCR) a likvidační (průtoková cytometrie). Protože celý proces apoptózy trvá několik hodin, výhodnou detekcí je fluorescenční detekce, která umožňuje sledování celého průběhu děje. Konkrétně byly vyvinuty *Essen Bioscience IncuCyte Caspase 3/7* reagentie, které uvolňují barvivo při aktivaci štěpených kaspáz 3/7 účastnících se apoptózy. Signál je zachycen fluorescenčním mikroskopem v inkubátoru a obrázky jsou analyzované softwarem S3 2017A. Nevýhodou jsou však vysoké náklady (Hanson K. M., Finkelstein N. J., 2019).

4.1.1.1. Průtoková cytometrie

Detekce apoptózy je založená na změnách morfologie buněk a biochemických vlastností doprovázené celý mechanismus programované buněčné smrti. Základní metodou monitorující tyto změny je průtoková cytometrie. Detekce buněk je umožněna jejich značením pomocí fluorochromů a díky specifickému rozptylu světla, který je detekován a převáděn do grafové podoby. Hlavní výhodou je možnost multiparametrální stanovení a rychlost analýzy. Mezi základní cytometrické testy prováděné pro zjištění specifických znaků apoptózy patří stanovení mitochondriálního membránového potenciálu, aktivace kaspázy (FLICA test), remodelace cytoplazmatické membrány (Annexin V test) a DNA fragmentace.

Pokles mitochondriálního membránového potenciálu je markrem časných apoptotických událostí. Principem je barvení lipofilními fluorescenčními kationty (tetramethylrhodamin methylester chloristan), který se komuluje v mitochondriích. Rozsah absorpce je měření intenzitou buněčné fluorescence a je přímoúměrný stavu apoptózy. Měření při 488nm argon-iontovým laserem zobrazuje v grafu světle zbarvené (+) živé buňky a tmavě zbarvené buňky s porušenou cytoplazmatickou membránou. Test FLICA je založen na použití inhibitorů kaspáz značených fluorochromem a detekce fluorescenční značky odpovídá vazbě FLICA-kaspázy v živých buňkách. Pokud aplikujeme propidium jodid, lze rozlišit jednotlivé fáze apoptózy. Další test je postaven na skutečnosti, že během apoptózy dochází k odkrytí fosfatidylserinu na vnější straně cytoplazmatické membrány. Annexin V se váže na fosfatidyl serin v přítomnosti Ca^{2+} iontů, a tím umožňuje vyhodnocení apoptotických buněk. Stanovení fragmentace DNA probíhá extrakcí DNA z buněk při barvení ve vodném prostředí po zafixování precipitačními činidly (ethanol/methanol).

Po extrakci se buňky obarví fluorochromem a detekují. Apoptotické buňky mají nižší frakční obsah DNA (Wlodkowic D., Skommer J., Darzynkiewicz Z., 2009).

4.2. Autofagie

Mezi další fyziologickou smrt patří autofagie (z řečtiny „*autos*“ = sebe, „*phagein*“ = pojídat), která využívá mechanismu degradace proteinového komplexu nebo organel a následně jejich znovuoobnovení. Základními typy autofagie je makroautofagie, mikroautofagie a autofagie zprostředkovaná chaperony. Podnětem aktivace může být deprivace živin, vznik kyslíkových radikálů, hypoxie, drogová stimulace, ER stres (Su Z. *et al*, 2015). Mezi nejdůležitější řídicí molekuly patří s Autofagií-sprízněné geny (*Autophagyrelated gens*; Atg_s), které se podílí v různých formách a komplexech na celém průběhu. Celkový proces zahrnuje iniciaci, nukleaci, vznik autofagozómu, vznik lysozomu a finální hydrolýzu. V iniciaci vzniká fagopór v důsledku agregace Atg1 komplexu. Dále se fagopór v průběhu nukleace transportuje na endoplazmatické retikulum a je kontrolován komplexem třídy 3, který vznikl ze dvou typů Atg proteinů a dvou kináz. Následně dochází k řetězové reakci za účelem expanze a uzavření autofagozómu. Fúzi zprostředkovávají SNARE proteiny (*Snub N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*). Při sníženém pH nastává konečná hydrolýza proteinů, organel, lipidů i nukleových kyselin (Chen Q. *et al*, 2018).

4.3. Nekróza

Nekróza patří mezi nefyziologickou smrt, která je ve většině případů neregulovaná. V průběhu nekrózy se zastavuje syntéza adenosintrifosfátu (ATP), zastavuje se proteosyntéza, zvyšuje se pasivní transport, převládá katabolismus. V primárních stádiích dochází k cytoplazmatickému otoku a následnému prasknutí membrány nebo organel. V důsledku uvolnění intracelulárních faktorů z usmrčené buňky dochází k lokálnímu zánětu, který po uvolnění do okolí rozpoznají buňky vlastního imunitního systému. Nekróza je vyvolaná důsledkem fyzikálně-chemického stresu (teplo, osmotický šok, zvýšená koncentrace peroxidu vodíku) nebo interakcí proteinu 1 (Berge Vanden T. *et al*, 2013; Koubek K., 2010).

Zvláštním typem nekrózy je programovaná nekróza, neboli nekroptóza. Termín byl poprvé použit v roce 2005, aby popsal neapoptickou buněčnou smrt

vyvolanou TNF-R1 (Chen Q. *et al*, 2018). Tato buněčná smrt probíhá podobnými signálními drahami jako apoptóza s rozdílem, že nedochází k aktivaci kaspáz. K aktivaci nekroptózy dochází několika způsoby, navázání členů rodiny receptorů smrti s ligandy (Fas, TNFR-1, TRAIL R1/2), navázání receptorů na T buňkách, intracelulárními senzory RNA a DNA, interferony nebo buněčnými stresovými faktory (ionizující záření, reaktivní druhy kyslíku, nadbytek vápníku, fotodynamická terapie). Všechny možnosti aktivace se zaměřují globálně na dvě hlavní molekuly, kterými je receptor interagující RIPK3 a pseudokináz doménu-like protein (*Pseudokinase mixed-lineage kinase domain-like protein*; MLKL). Následuje fosforylace, oligomerizace, translokace a vložení do intracelulárních membrán. Dle nedávných výzkumů bylo dokázáno, že přímý vliv smrti způsobuje vazba na fosfatidylinositol fosfátové membrány nebo vyšší koncentrace vápníku a sodíku procházející přes iontové kanály (Chico Fuchslocher J. *et al*, 2017).

4.4. Důležité molekuly

Pro volbu mezi apoptickou a autofagickou smrtí je klíčový Beclin-1. Patří do antiapoptotických členů BH 3 rodiny a je klíčový pro uspořádání autofagosomu. Interakce s proteiny Bcl-2 nebo Bcl-xl stimuluje blokaci autofagické smrti skrz BH 3 domény a spouští apoptickou smrt. Naopak protein NOXA z BH3 rodiny má schopnost přemístit Bcl-2 členy z Beclinu-1 a spustit autofagickou smrt. Mezi další vlastnosti Beclinu-1 patří schopnost štěpit kaspázové proteiny, jako je kaspáza-8 nebo kaspáza-3, a tím posunout autofagickou smrt na apoptickou smrt.

Další důležitou látkou je serin/threonin proteinová kináza (*mammalian target of rapamycin*; mTOR), která aktivuje komplex mTORC1 a komplex mTORC2. Hlavní úlohou mTORC1 je kontrola buněčného růstu, buněčné energie a hladin kyslíku. Uspořádání cytoskeletu a reakci buněk při ohrožení jejich života řídí mTORC2. Komplex se aktivuje přísunem živin či růstovými faktory, aktivovaný podporuje anabolické procesy, mezi které patří syntéza proteinu, lipidů, nukleotidů, což vede k buněčnému růstu. Současně nastává inhibice katabolických procesů, které jsou spojené s inhibicí autofagie. Pokud nastanou stresové podmínky (nízká energie, zvýšení poměru AMP/ATP), inaktivuje se mTORC1 a stimuluje se tvorba pro-autofagického komplexu, který vede k tvorbě autofagosomů (Rabanal-Ruiz Y. *et al*, 2017; Chen Q. *et al*, 2018).

5. ZÁVĚR

Apoptóza je důležitý proces, jehož aktivace zahrnuje celou řadu molekul a je doprovázen typickými morfologickými a biochemickými událostmi. Důležitým znakem je zhuštění cytoplazmy, pyknóza s následnou karyorhýzou jádra a v poslední fázi tvorba apoptotických tělísek. Na základě těchto znalostí je postavena detekce průběhu apoptózy. Klasickou metodou je průtoková cytometrie využívající barvení buněk fluorochromem, nevýhodou je však neschopnost sledování delšího průběhu reakce, proto se v dnešní době používá pro monitorování průběhu apoptózy fluorescenční barvení

Významnou úlohu v apoptóze hraje JNK kináza, jejíž signální dráha je již dobře známá a popsána. Předností je schopnost JNK reagovat na odlišné typy stimulů od zánětlivých faktorů až po virové signály. Aktivace probíhá fosforylací MKK4 nebo MKK7 a aktivovaná forma hlavně reguluje expresi c-Jun, proteinu p53 nebo umožňuje tvorbu pro-apoptotických genů. Úlohou v organismu je převážně udržení homeostázy a regulace optimální exprese JNK izoform. Bylo dokázáno, že JNK se účastní také vzniku řady karcinomů a je nedílnou součástí chemorezistence. Známý inhibitor potenciálně používaný pro léčbu nádoru SP600125 je nejvíce prostudovaným inhibitorem JNK, chybí však dostatečná eliminace nežádoucích účinků. Použití JNK pro klinické účely zatím není možné, výzkum ale neustále probíhá a lze říci, že do budoucna má potenciál zdokonalit léčbu.

6. Zdroje

1. Arthur J. S., Ley S. C.: *Mitogen-activated protein kinases in innate immunity*. Nat Rev Immunol 13, 2013, 679–692, 10.1038/nri3495.
2. Arya R., White K.: *Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms*. Seminars in Cell and Developmental Biology 39, 2015, 12-19, 10.1016/j.semcdb.2015.02.001.
3. Bender Ch. E., Fitzgerald P., Tait S. W. G.; *et al.*: *Mitochondrial pathway of apoptosis is ancestral in metazoans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109, 13, 2012, 4904-4909, 10.1073/pnas.1120680109.
4. Berghe V. T., Grootjans P., Goossens V.; *et al.*: *Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo*. Methods 61, 2013, 117-129, 10.1016/j.ymeth.2013.02.011.
5. Bogoyevitch M. A., Ngoei K. R. W., Zhao T. T., Yeap Y. Y. C.; *et al.*: *c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: Recent advances and challenges*. Biochimica et Biophysica Acta 1804, 2010, 463-475, 10.1016/j.bbapap.2009.11.002.
6. Bubici C., Papa S.: *JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets*. British Journal of Pharmacology 171, 2014, 24-37, 10.1111/bph.12432.
7. Cellulare C., Girnius N., Jiang F., Cavanagh-Kyros J.; *et al.*: *Role of JNK in mammary gland development and breast cancer*. Cancer Res 72, 2, 2012, 472-481, 10.1158/0008-5472.CAN-11-1628.
8. Cellurale C., Sabio G., Kennedy N. J., Das M.; *et al.*: *Requirement of c-Jun NH₂-terminal kinase for Ras-initiated tumor formation*. Mol Cell Biol 31, 2011, 565–1576, 10.1128/MCB.01122-10.
9. Czaja M. J.: *JNK regulation of hepatic manifestations of the metabolic syndrome*. Trends in Endocrinology and Metabolism 21, 12, 2010, 707-713, 10.1016/j.tem.2010.08.010.
10. Dai Z.-J., Gao J., Ma X.-B., Yan K.; *et al.*: *Up-regulation of hypoxia inducible factor-1 α by cobalt chloride correlates with proliferation and apoptosis in PC-2 cells*. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research 31, 28, 2012, doi:10.1186/1756-9966-31-28.

11. Dhanasekaran D. N., Reddy P. E.: *JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death*. Impact journals: Genes and Cancer 8, 9-10, 2017, 668-694, 1947-6027.
12. Dhanasekaran D. N., Reddy Premkumar E.: *JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death*. Genes and Cancer 8, 9-10, 2017, 682-694, doi?
13. Galluzzi L., Brenner C., Morselli E., Touat Z.; *et al.*: Viral control of Mitochondrial Apoptosis. PLoS Pathog 4, 5, 2008, 1-16, 10.1371/journal.ppat.1000018.
14. Ganz D., Donin N., Fishelson Z.: *Involvement of the c-Jun N-terminal kinases JNK1 and JNK2 in complement-mediated cell death*. Molecular Immunology 47, 2-3, 2009, 310-317, 10.1016/j.molimm.2009.09.016.
15. Gordon K. J., Blobe G. C.: Role of transforming growth factor- β superfamily signaling pathways in human disease. Biochimica et Biophysica Acta 1782, 2008, 197-228, 10.1016/j.bbdis.2008.01.006.
16. Grynberg K., Ma Frank Y., Nikolic-Paterson D.: *The JNK Signaling Pathway in Renal Fibrosis*. Renal and Epithelial Physiology, a section of the journal Frontiers in Physiology 9, 829, 2017, 1-12, 10.3389/phys.2017.00829.
17. Han S. M., Jung Y. D., Morel C., Lakhani A. S.; *et al.*: *JNK Expression by Macrophages Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance and Inflammation*. Scienceexpress 6, 2012, 1-3, 10.1126/science.1227568.
18. Hanson K. M., Finkelstein N. J.: *An accessible and high-throughput strategy of continuously monitoring apoptosis by fluorescent detection of caspase activation*. Analytical Biochemistry 564-565, 2019, 96-101, 10.1016/j.ab.2018.10.022.
19. Hattori K., Naguro I., Runchel Ch., Ichijo H.: *The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases*. Cell communication and Signaling 7, 9, 2009, 1-10, 10.1186/1478-811X-7-9.
20. Higgings P. J.: *Transcription Factors: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology 647, 2010, 31-36, 10.1007/978-1-60761-738-9_2.
21. Hoffmann G., Breitenbücher F., Schuler M., Ehrenhofer-Murray Anna E.: *A Novel Sirtuin 2 (SIRT2) Inhibitor with p53-dependent Pro-apoptotic Activity in Non-small Cell Lung Cancer*. Journal of Biological chemistry 289, 8, 2014, 5208-5216, 10.1074/jbc.M113.487736.

22. Huang G., Shi L. Z., Chi H.: *Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination*. Cytokine 48, 3, 2009, 161-169, 10.1016/j.cyto.2009.08.002.
23. Chen Q., Kang J., Fu C.: *The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis*. Signal Transduction and Targeted Therapy 3, 18, 2018, 1-7, 10.1038/s41392-018-0018-5.
24. Chico F. J., Saggau C., Adam D.: *Proteolytic control of regulated necrosis*. BBA Molecular Cell Research 1864, 2017, 2147-2161, 10.1016/j.bbamcr.2017.05.025.
25. Chung, Pharm. D. Clement.: *Restoring the swch for cancer cell death: Targeting the apoptosis signaling pathway*. Am J Health-Syst Pharm 75, 13, 2018, 945-952, 10.2146/ajhp170607.
26. Ippagunta S. K., Pollock J. A., Sharma N., Lin, W.; et al.: *Identification of Toll-like receptor signaling inhibitors based on selective activation of hierarchically acting signaling proteins*. Science Signaling 11, 543, 1077, 2018, 1-14, 10.1126/scisignal.aag1077, 1937-9145.
27. Kim E. K., Choi Eui-Ju.: *Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases*. Biochimica et Biophysica Acta 1802, 2010, 396-405, 10.1016/j.bbadis.2009.12.009.
28. Kim Y. J., Kang K. S., Choi K. C., Ko H.: *Cardamonin induces autophagy and an antiproliferative effect through JNK activation in human colorectal carcinoma HCT116 cells*. Bioorg Med Chem Lett. 25, 12, 2015, 2559-2564.
29. Kovalic A. J., Satapathy, Sanjaya K., Chalasani N.: *Targeting incretin hormones and the ASK-1 pathway as therapeutic options in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis*. Hepatology International 12, 2018, 97-106, 10.1007/s12072-018-9854-1.
30. Kragelj J., Palencia A., Nanao M. H, Maurin D.; et al.: *Structure and dynamics of the MKK7-JNK signaling complex*. PNAS Direct Submission 112, 11, 2015, 3409-3414, 10.1073/pnas.1419528112.
31. Kuan C. Y., Yang D. D., Samanta R. D. R., Davis R. J.; et al.: *The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development*. Neuron 22, 1999, 667-676, 10.1016/S0896-6273(00)80727-8.

32. Laine A., Ronai Z.: *Ubiquitin Chains in the Ladder of MAPK Signaling*. *Science Signaling* 5, 281, 2005, 1-11, 10.1126/stke.2812005re5 , 1937-9145.
33. Liu X., Zhang Chen-S., Lu Ch., Lin Sheng-C.; *et al.*: *A conserved motif in JK/p38-specific MAPK phosphatases as a determinant for JNK1 recognition and inactivation*. *Nature Communications* 7, 10879, 2016, 1-12, 0.1038/ncomms10879.
34. Magalhaes G. J., Lee J., Geddes K., Rubino P.; *et al.*: *Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands*. *European Journal of Immunology* 41, 5, 2011, 10.1002/eji.201040827.
35. McIlwain, David R., Berger T., Mak T. W.: *Caspase Functions in Cell Death and Disease*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 5, 2013, 10.1101/cshperspect.a008656.
36. Mei Y., Wu M.: *Noncoding RNAs Regulating p53 and c-Myc Signaling*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 927, 2016, 337- 365, 10.1007/978-981-10-1498-7_13.
37. Messoussi A., Feneyrolles C., Bros A., Deroide A.; *et al.*: *Recent Progress in the Design, Study, and Development of c-Jun N-Terminal Kinase Inhibitors as Anticancer Agents*. *Chemistry and Biology* 21, 2014, 1433-1443, 10.1016/j.chembiol.2014.09.007.
38. Moon D. O., Kim M. O., Kang Ch. H., Lee J. D.; *et al.*: *JNK inhibitor SP600125 promotes the formation of polymerized tubulin, leading to G2/M phase arrest, endoreduplication, and delayed apoptosis*. *Experimental and Molecular medicine* 41, 9, 2009, 665-677, 10.3858/emm.2009.41.9.073.
39. Moskalev A. A., Smit-McBride Z., Shaposhnikov M. V., Plyusnina E. N.; *et al.*: *GADD45 proteins: Relevance to aging, longevity and age-related pathologies*. *Ageing Research Reviews* 11, 2012, 51-66, 10.1016/j.arr.2011.09.003.
40. Ngoei R. W. K., Ng C. H. D., Gooley R. P., Fairlie D. P.; *et al.*: *Identification and characterization of bi-thiazole-2,2'-diamines as kinase inhibitory scaffolds*. *Biochim Biophys Acta* 1834, 2013, 1077–1088, 10.1016/j.bbapap.2013.02.001.
41. Okamura T., Antoun G., Keir Stephen T.; *et al.*: *Phosphorylation of Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) by Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Promotes Formation of the GSTP1-c-Jun N-terminal kinase (JNK) Complex and Suppresses JNK Downstream Signaling and Apoptosis in Brain Tumor*

- Cells*. The journal of biological chemistry 290, 52, 2015, 30866-30878, 10.1074/jbcM115.656140.
42. Ondroušková E., Vojtěšek B.: *Programovaná buněčná smrt v nádorových buňkách*. Regionální centrum aplikované molekulární onkologie 27, 1, 2014, 7-14.
 43. Origlia N., Arancio O., Domenici L., Yan S. S.: *MAPK, b-amyloid and synaptic dysfunction: the role of RAGE*. Expert Reviews Neurother 9, 11, 2009, 1635-1645, 10.1586/ERN.09.107.
 44. Ozaki T., Nakagawara A.: *Role of p53 in Cell Death and Human Cancers*. Cancers 3, 2011, 994-1013, 10.3390/cancers3010994.
 45. Pal M., Febbraio M. A., Lancaster I. G.: *The roles of c-Jun NH₂-terminal kinases (JNKs) in obesity and insulin resistance*. The Journal of Physiology 594.2, 2016, 267-279, 10.1113/JP271457.
 46. Pal M., Wunderlich M. C., Spohn G., Brönneke S. H.; *et al.*: *Alteration of JNK-1 Signaling in Skeletal Muscle Fails to Affect Glucose Homeostasis and Obesity-Associated Insulin Resistance in Mice*. Plos one 8, 1, 2013, 1-13, 10.1371/journal.pone.0054247.
 47. Perry J. R., Camporez J.-P. G., Kursawe R., Titchenell M. P.; *et al.*: *Hepatic Acetyl CoA Links Adipose Tissue Inflammation to Hepatic Insulin Resistance and Type 2 Diabetes*. Cell 160, 4, 2015, 745-758, 10.1016/j.cell.2015.01.012.
 48. Peti W., Page R.: *Molecular basis of MAP kinase regulation*. The Protein Society 22, 2013, 1698-1710, 10.1002/pro.2374.
 49. Pietkiewicz S., Sohn D., Piekorz R. P.; *et al.*: *Oppositional regulation of Noxa by JNK1 and JNK2 during apoptosis induced by proteasomal inhibitors*. PLoS One 8, 4, 2013, e61438.
 50. Rabanal-Ruiz Y., Otten E. G., Korolchuk V. I.: *mTORC1 as the main gateway to autophagy*. Essays in Biochemistry, 61, 2017, 565-584, 10.1042/EBC20170027.
 51. RNDr. Koubek K., DRSC.: *Programovaná buněčná smrt aneb fenomén apoptózy*. Informační magazín: in vitro diagnostika 14, 2010, 10-22.
 52. Ruan W., Lim H. H., Surana U.: *Mapping Mitotic Death: Functional Integration of Mitochondria, Spindle Assembly Checkpoint and Apoptosis*. Frontiers. Cell and Developmental Biology 6, 177, 2019, 1-7, 10.3389/fcell.2018.00177.

53. Sabio G., Kennedy J. N., Cavanagh-Kyros J., J. Y. D.; *et al.*: *Role of Muscle c-Jun NH₂-Terminal Kinase 1 in Obesity-Induced Insulin Resistance*. *Molecular and Cellular Biology* 30, 1, 2010, 106-115, 10.1128/MCB.01162-09.
54. Salvador J. M., Brown-Clay Joshua D., Fornace A. J. Jr.: *Gadd45 in Stress Signaling, Cell Cycle Control, and Apoptosis*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 793, 2013, 1-19, 10.1007/978-1-4614-8289-5_1.
55. Santabárbara-Ruiz P., Esteban-Collado J., Pérez L., Viola G.; *et al.*: *Ask1 and Akt act synergistically to promote ROS-dependent regeneration in Drosophila*. *PLOS Genetics* 15, 1, 2019, 1-27, 10.1371/journal.pgen.1007926.
56. Seki E., Brenner D. A., Karin M.: *A Liver Full of JNK: Signaling in Regulation of Cell Function and Disease Pathogenesis, and Clinical Approaches*. *Gastroenterology* 143, 2, 2012, 307-320, 10.1053/j.gastro.2012.06.004.
57. Shaha Ch., Tripathi R., Mishra D. P.: *Male germ cell apoptosis: regulation and biology*. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 365, 1546, 2010, 1501-1515, 10.1098/rstb.2009.0124.
58. Shibuya H., Yamaguchi K., Shirakabe K., Tonegawa A.; *et al.*: *TAB1: An Activator of the TAK1 MAPKKK in TGF- β Signal Transduction*. *Science* 272, 1996, 1179-1182.
59. Solinas G., Becattini B.: *JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response*. *Molecular Metabolism* 6, 2017, 174-184, 10.1016/j.molmet.2016.12.001.
60. Song J., Park A. P., Lee T. W., Lee E. J.: *Apoptosis Signal Regulating Kinase 1 (ASK1): Potential as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease*. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 2014, 2119-2129, 10.3390/ijms15022119.
61. Song W. H., Son H., Kim S. W., Paick J-S.; *et al.*: *Role of Jun amino-terminal kinase (JNK) in apoptosis of cavernosal tissue during acute phase after cavernosal nerve injury*. *Asian Journal of Andrology* 20, 2018, 50-55, 10.4103/aja.aja_10_17.
62. Su Z., Yang Z., Xu Y., Chen Y.; *et al.*: *Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis*. *Molecular Cancer* 14, 48, 2015, 10.1186/s12943-015-0321-5.
63. Suddason T., Anwar P., Charlaftis N., Gallagher E.: *T-Cell-Specific Deletion of Map3k1 Reveals the Critical Role for Mekk1 and Jnks in Cdkn1b- Dependent*

- Proliferative Expansion*. Cell reports 14, 2016, 449-457, 10.1016/j.celrep.2015.12.047.
64. Sun Y., Zhang D., Mao M., Lu Y.; *et al.*: *Roles of p38 and JNK protein kinase pathways activated by compound cantharidin capsules containing serum on proliferation inhibition and apoptosis of human gastric cancer cell line*. Experimental and therapeutic medicine 14; 2017, 1809-1817, 10.3892/etm.2017.4704.
 65. Wang J., Tai G.: *Role of c-Jun N-terminal kinase in hepatocellular carcinoma development*. Target Oncol. 11, 6, 2016, 723-738.
 66. Wang W., Shi L., Xie Y., Ma Ch.; *et al.*: *SP600125, a new JNK inhibitor, protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease*. Neurpscience Research 48, 2, 2004, 195-202, 10.1016/j.neures.2003.10.012.
 67. Westermarck J.: *Regulation of Transcription Factor Function by Targeted Protein Degradation: An Overview Focusing on p53, c-Myc, and c-Jun*. Methods in Molecular Biology 647, 2010, 31-36, 10.1007/978-1-60761-738-9_2.
 68. Whittington R. A., Bretteville A., Dickler M. F.: *Anesthesia and Tau Pathology*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 47, 2013, 1-19, 0.1016/j.pnpbp.2013.03.004.
 69. Win P., Than T. A., Kaplowitz N.: *The regulation of JNK Signaling Pathways in Cell Death throught the Interplay with Mitochondrial SAB and Upstream Post-Translational Effects*. International Journal of Molecular Sciences19, 3657, 2018, 1-14, 10.3390/ijms19113657.
 70. Wlodkowic D., Skommer J., Darzynkiewicz Z.: *Flow Cytometry-Based Apoptosis Detection*. Methods in Molecular Biology 559, 2009, 19-31, 10.1007/978-1-60327-017-5_2.
 71. Wu Q, Wang X, Wan D, Li J.; *et al.*: *Crosstalk of JNK1-STAT3 is critical for RAW264.7 cell survival*. Cell Signal 26, 12, 2014, 2951-2960.
 72. Wu Q., Wu W., Fu B., Shi L.; *et al.*: *JNK signaling in cancer cell survival*. Med Res Rev, 2019, 1-23, 10.1002/med.21574.
 73. Wuerzberger-Davis Shelly M., Miyamoto P.: *TAK-ling IKK Activation: "Ub" the Judge*. Science signaling 3, 105, 2010, 1-3, 10.1126/scisignal.3105pe, 1937-9145.

74. Xu D., Zhang F., Wang Y., Sun Y.; *et al.*: *Microcephaly-Associated Protein WDR62 Regulates Neurogenesis through JNK1 in the Developing Neocortex*. *Cell Reports* 6, 2014, 104-116, 10.1016/j.celrep.2013.12.016.
75. Xu X., Lai Y., Hua Z.: *Apoptosis and apoptotic body:disease message and therapeutic target potentials*. *Bioscience Reports* 39, 2019, 1-8, 10.1042/BSR20180992.
76. Yang X.-j., Chen G.-l., Yu S.-c., Xu Ch.; *et al.*: *TGF- β 1 enhances tumor-induced angiogenesis via JNK pathway and macrophage infiltration in an improved zebrafish embryo/xenograft glioma model*. *International Immunopharmacology* 15, 2013, 193-198, 10.1016/j.intimp.2012.12.002.
77. Yasuda J., Whitmarsh A. J., Cavanagh J., Sharma M.; *et al.*: *The JIP Group of Mitogen-Activated Protein Kinase Scaffold Proteins*. *Molecular and Cellular Biology* 19, 10, 1999, 7245-7254, 0270-7306/99/\$04.00+0.
78. Yoon Mi-K., Ha Ji-H., Lee Min-S., Chi Seung-W.: *Structure and apoptotic function of p73*. *BMB reports* 48, 2, 2015, 81-90, 10.5483/BMBRep.2015.48.2.255.
79. Zeke A., Bastys T., Alexa A., Garai Á.; *et al.*: *Systematic discovery of linear binding motifs targeting an ancient protein interaction surface on MAP kinases*. *Molecular Systems Biology* 11, 837, 2015, 1-21, 10.15252/msb.20156269.
80. Zeke A., Misheva M., Reményi A., Bogoyevitch M. A.: *JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80, 3, 2016, 793-82, 10.1128/MMBR00043- 14.
81. Zhang T., Inesta-Vaquera F., Niepel M., Zhang J.; *et al.*: *Discovery of potent and selective covalent inhibitors of JNK*. *Chem Biol.* 140, 1, 2012, 10.1016/j.chembiol.2011.11.010.
82. Zheng Y., Zhao Y., Chen J., Li B.; *et al.*: *JNK inhibitor SP600125 protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury via upregulation of claudin-4*. *Experimental and therapeutic medicine* 8, 2014, 153-158, 10.3892/etm.2014.1684.
83. Zhou Y. Y., Li Y., Jiang W. Q., Zhou L. F.: *MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway*. *Biosci Rep.* 35, 3, 2015, e00199.