



UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
JESSENIOVA LEKÁRSKA FAKULTA V MARTINE
Ústav lekárskej biochémie



VÝZNAMNÉ SIGNÁLNE DRÁHY A MOLEKULY PRI APOPTÓZE

(skriptá)

Jozef HATOK

Martin, 2016

Autor: **RNDr. Jozef Hatok, PhD.**
Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova lekárska fakulta v Martine
Ústav lekárskej biochémie
Malá Hora 11161/4D
03601 MARTIN

Recenzenti: prof. MUDr. Marian Adamkov, CSc.
prof. Ing. Mária Mareková, CSc.

Obsah vzdelávacieho materiálu neprešiel špecializovanou terminologickou, jazykovou, gramatickou a štylistickou korektúrou. Za uvedené stránky vzdelávacieho materiálu zodpovedá autor.

Vydavateľ: Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova lekárska fakulta v Martine

ISBN: **978-80-8187-008-8**

EAN: **9788081870088**

PodĎakovanie:

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-0224-12 a projektom „Zvýšenie možností kariérneho rastu vo výskume a vývoji v oblasti lekárskeho vied“, ITMS kód projektu: 26110230067 spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho sociálneho fondu. Za odbornú a štylistickú kritiku by som sa rád poďakoval doc. Mgr. Eve Babušíkovej, PhD.

OBSAH

Zoznam skratiek	6
Úvod	8
1 Vývoj pojmu „apoptóza“	9
2 Definícia apoptózy a ďalších typov bunkovej smrti	12
2.1 Rozdiely oproti nekróze	12
2.2 Autofágia	14
2.3 Paraptóza	15
2.4 Mitotická katastrofa	15
3 Kľúčové molekuly v apoptóze	17
3.1 Kaspázy	17
3.1.1 Významné kaspázy a ich mechanizmus aktivácie	17
3.1.2 Substráty kaspáz	19
3.2 TNF a jeho receptory	19
3.2.1 TRAIL indukovaná apoptóza a mechanizmus jej rezistencie	22
3.3 Proteíny bcl-2 rodiny	23
3.3.1 Proteíny antiapoptotickej skupiny	25
3.3.2 Proapoptotické multidoménné proteíny	29
3.3.3 Výhradne BH3 proteíny	30
3.4 Adaptorové proteíny	31
3.5 Ďalšie významné molekuly v rozvoji apoptózy	32
3.5.1 p53	32
3.5.2 NFκB	36
3.5.3 AKT kináza	40
3.5.4 Fosfatidylinozitol-3-fosfokináza	40
3.5.5 Myc	41

<u>4</u>	<u>SIGNÁLNE DRÁHY APOPTÓZY</u>	<u>43</u>
4.1	Vonkajšia dráha	45
4.2	Vnútorná dráha	46
4.3	Kaspázová koncová dráha	47
4.4	Dráha PI3K/AKT/mTOR	48
<u>5</u>	<u>Regulácia apoptózy a jej úloha pri nádoroch</u>	<u>50</u>
<u>6</u>	<u>Zoznam použitej literatúry</u>	<u>53</u>

ZOZNAM SKRATIEK

aAP	antiapoptotický/é
AIF	apoptózu indukujúci faktor
AIP1	ASK1-interagujúci proteín 1A
AKT/PKB	proteín kináza B
AMK	aminokyselina
AP	apoptóza
AP1	aktivátor proteínu-1
Apaf-1	apoptotický proteázomový aktivačný faktor-1
ASK1	apoptózu signalizujúca kináza-1
Bad	Bcl-2 asociovaný proteín
Bak	Bcl-2 agonistický zabijak 1
Bak	Bcl-2 homológny antagonista
Bax	Bcl-2 asociovaný X proteín
Bcl-2	proteín B bunkového lymfómu-2
Bim	Bcl-2 interaktívny mediátor bunkovej smrti
BMF	Bcl-2 modifikujúci faktor
Bok	Bcl-2 ovariálny smrtiaci proteín
CAD	kaspázou aktivovaná DNáza
CARD	kaspázu získavajúca doména
CD95	Fas povrchový receptor bunkovej smrti
cyt-c	cytochróm-c
DD	doména pre smrť
DED	efektorová doména smrti
DISC	smrť indukujúci signalizačný komplex
EFG	epidermálny rastový faktor
I κ B	inhibičná podjednotka NF- κ B
ICAD	inhibítor kaspázou aktivovanej DNázy
IKK	I κ B kináza
MIT	mitochondriálnej
NIK	NF- κ B-indukujúca kináza
p53	tumor supresorový proteín p53
pAP	proapoptotický/é
PBS	programovaná bunková smrť
PUMA	p53-nadregulovaný modulátor apoptózy

SMAC	sekundárny mitochondriálny aktivátor kaspáz
TNF	tumor nekrotizujúci faktor
TNF-Rc	receptor pre tumor nekrotizujúci faktor
TRAIL	TNF-apoptózu indukujúci ligand

ÚVOD

Vložením slov „apoptosis“ a „cancer“ do PubMed databázy získame v súčasnosti cez viac ako 140 tisíc referencií. Význam mechanizmu spúšťania apoptózy, resp. rezistencie buniek na apoptózu, je kľúčovým pri rozvoji nádorových chorôb. Úvod tohto vzdelávacieho materiálu je orientovaný na časovú os dôležitých objavov o apoptóze. Následné sú rozoberané ďalšie typy bunkovej smrti a potom významné proteíny spojené s apoptotickou kaskádou. Vo štvrtej časti sú predstavené hlavné signálne dráhy apoptózy. Záver publikácie poukazuje na reguláciu apoptózy a jej úlohu pri vzniku nádorov.

Skriptá sú určené pre študentov pregraduálneho štúdia prírodovedeckých odborov a štúdia všeobecného lekárstva, ako aj pre študentov postgraduálneho štúdia v odboroch Lekárska chémia a biochémia, Klinická biochémia, Molekulová biológia a Biológia.

1 VÝVOJ POJMU „APOPTÓZA“

Slovo „apoptosis“ pochádza z gréckeho písomníctva. Tento termín navrhol profesor James Cormack z katedry gréčtiny na Aberdeenskej univerzite. Z gréckeho pojmu určeného pre opadávanie lupeňov z kvetov či listov zo stromov mu opäť vrátil jeho medicínske použitie, hoci trochu iného významu ako mu dali Gréci pred dvoma tisícročiami – Hippokrates používal termín apoptosis pre „opadávanie mäsa z kostí“.

Apoptóza (AP), čiže programovaná bunková smrť (PBS), alebo bunková samovražda je fyziologicko-genetický riadený proces autodeštrukcie bunky. Tento proces je aktivovaný zanikajúcou bunkou v situácii, keď sa stáva pre tkanivo, resp. organizmus nepotrebnou, čiže škodlivou. Vyskytuje sa u všetkým mnohobunkových a u niektorých jednobunkových organizmov a má základný význam v obrane (proti vírusom i baktériám), v morfogénéze, homeostáze, ontogénéze a funkcii imunitného systému. Apoptóza je taktiež odpoveďou na rôzne poškodenia, najmä pri degeneratívnych a nádorových chorobách [Sankari a kol., 2012].

Apoptotický program, ktorý je uložený v genóme každej bunky, je aktivovaný len u tých buniek, ktoré sú odsúdené na zánik v danom čase. Tieto bunky sú zničené sériou postupných udalostí, ktoré sú riadené súborom určitých génov. Apoptotická bunková smrť je esenciálna pre správny vývoj orgánov a tkanív, pričom nemá na tieto tkanivá žiadne deštruktívne účinky. Zlyhanie apoptózy môže spôsobiť ťažké anomálie, počnúc vývojovými poruchami až po rozvoj onkologických chorôb [Galluzzi a kol., 2007]. Samotná AP nastáva počas normálneho vývoja viacbunkových organizmov a pokračuje v priebehu dospievania. Súhra apoptózy a bunkovej proliferácie je významná pri tvarovaní samotných tkanív a orgánov počas embryonálneho vývoja. Apoptóza sa tiež výrazne podieľa na regulácii imunitného systému. T-lymfocyty sú bunky imunitného systému, ktoré sú dôležité pri ničení infikovaných alebo poškodených buniek v ľudskom tele. Skôr než dospejú v týmuse, sa pomocou zdravých buniek v krvnom riečisku zaisťuje ich účinok proti cudzím antigénom. Akékoľvek neúčinné alebo samo-reaktívne T-bunky sú prostredníctvom indukovanej apoptózy odstránené [Lemasters, 2007].

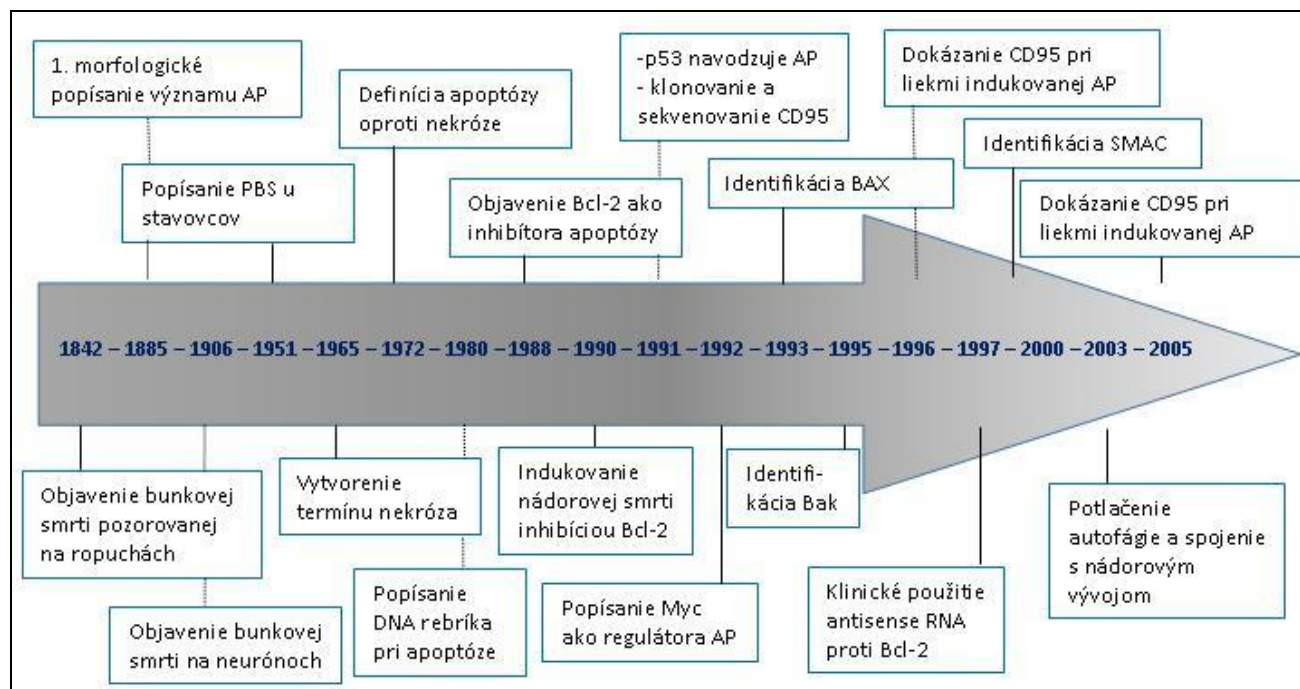
Štúdium apoptózy sa datuje od polovice 19stého storočia. Koncept prirodzenej bunkovej smrti, neskôr známej ako apoptóza, bol prvýkrát spomenutý v roku 1842 Carlom Vogtom, ktorý prvé experimenty vykonal na modeloch žiab [Vogt, 1842]. Prvý morfológický popis bol poskytnutý Waltherom Flemmingom v roku 1885, ktorý elegantne vykreslil bunkový úbyt看, jadrové rozštiepenie a apoptotické formovanie bunkového tela [Flemming W., 1885]. Nasledoval takmer storočný úpadok v študovaní apoptózy, až do roku 1951, keď Alfred Glucksman opísal „karyopyknózu“ ako odlišnú formu bunkovej smrti charakterizovanú jadrovou redukciou a kondenzáciou chromatinu [Glucksmann, 1951].

Saunders a Lockshins pracovali na úlohe bunkovej smrti pri vyvíjaní krídiel u hmyzu a vtákov [Saunders, 1966]. Dosiahnuté závery experimentov využil v šesťdesiatych rokoch austrálsky patológ Kerr na opísanie nezvyčajnej formy smrti pri ischemickom poškodení pečeneového tkaniva [Kerr, 1965]. Nasledovala až publikácia v *Nature* roku 1980 [Wyllie, 1980] popisujúc indukciu apoptózy u tymocytov spojenú s aktiváciou endogénnych endonukleáz, ktorým ďalší vedci začali prikladať významnú úlohu. Pokračovaním bol prehľadový článok toho istého roku, ktorý dával apoptóze biologickú dôležitosť [Wyllie a kol., 1980]. V osemdesiatych rokoch 20tého storočia výskumníci objavili spojitosť medzi štiepením DNA pri apoptóze a indukciou endonukleázy, čím dokázali, že jej aktivita je závislá na prítomnosti kalciových iónov [Jones a kol., 1989]. Ešte dva roky predtým vyslovil Wyllie základné axiomy vo vzťahu k apoptóze po účinku toxických látok:

- i. apoptóza je indukovaná škodlivými stimulmi menšej sily, ako u rovnakých buniek postihnutých nekrozou;
- ii. apoptóza sa ľahšie vyvolá u takých bunkových skupín, ktoré za fyziologických podmienok vykonávajú rýchlu obmenu bunkovej populácie [Wyllie, 1987].

Významným zvratom pri definovaní apoptózy na základe cytogenetických a biochemických pozorovaní bola charakterizácia DNA rebríka (štiepenie DNA na mnohopočetné fragmenty) považovaného za biochemický marker pre apoptózu [Enari a kol., 1998].

V roku 2002 sa Bob Horvitz podieľal na Nobelovej cene v oblasti fyziológie a medicíny za jeho prvotnú prácu rozuzlenia základných aspektov biológie apoptózy na systéme *Caenorhabditis elegans* [Horvitz, 2003]. Detailný časový prehľad výskumných objavov v spojení s apoptózou je znázornený na obrázku 1.



Obrázok 1: **Chronologický časový priebeh nadobudnutých poznatkov pri apoptóze.** Význam skratiek: AP – apoptóza; PBS – programovaná bunková smrť; Bcl-2 – proteín B bunkového lymfómu-2; p53 – nádorový proteín p53; Myc – c-Myc regulačný gén; CD95 – Fas povrchový receptor bunkovej smrti; Bak – Bcl-2 homológny antagonista; BAX – Bcl-2 asociovaný X proteín; SMAC – sekundárny mitochondriový aktivátor kaspáz.

2 DEFINÍCIA APOPTÓZY A ĎALŠÍCH TYPOV BUNKOVEJ SMRTI

Apoptóza, najčastejšie označovaná ako za „bunkovú samovraždu“, je vysoko regulovaný proces u väčšiny eukaryotov. V rámci každého dňa v ľudskom tele balansuje s apoptózou viac ako 10 biliónov buniek. Apoptóza je definovaná ako forma **programovanej bunkovej smrti** (PBS) v multibunkovom organizme. Predstavuje jeden z hlavných typov PBS a vyžaduje sériu biochemických udalostí vedúcich k charakteristickej zmene bunkovej morfológie. Apoptóza je nevyhnutná pri vývoji normálnych buniek, tkanivovej homeostáze, embryogenéze, potlačení a udržaní imunitnej tolerancie, vývoji nervového systému a hormonálne závislej tkanivovej atrofii [Ghatage a kol., 2014].

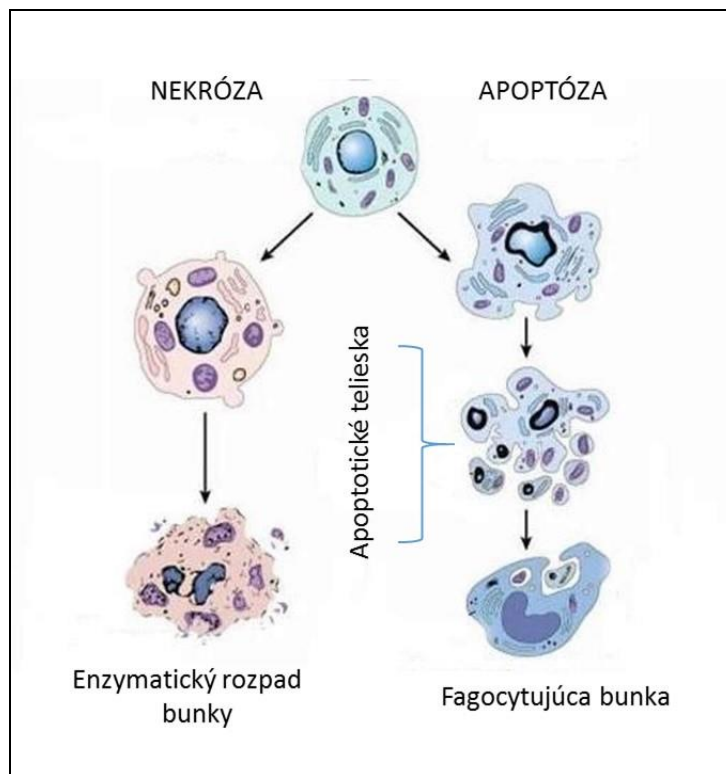
2.1 ROZDIELY OPROTI NEKRÓZE

Mechanizmy bunkovej smrti možno rozdeliť do dvoch hlavných kategórií podľa toho, či bunková smrť prebieha podľa určitého programu alebo nie. Riadená alebo programovaná bunková smrť sa najčastejšie vyskytuje formou apoptózy. Na druhej strane neriadená bunková smrť predstavuje neočakávanú deštrukciu bunky, ktorá za normálnych okolností nebola určená k zániku. Najznámejšou formou neriadenej bunkovej smrti je nekróza. Podobne ako v prípade apoptózy aj nekróza bola popísaná ako významný typ smrti buniek so zreteľnou morfológickou charakteristikou. Bunky podľahnú nekrotickej smrti, keď sú vystavené extrémnemu stresu. Rôzne typy buniek môžu odolávať rôznym stupňom stresu, počnúc stredným a končiac ťažkým stresom. Hoci sú všetky bunky vybavené regulačnými mechanizmami, ktoré môžu tlmieť enviromentálne fluktuácie a stabilizovať vnútrobunkové prostredie, schopnosť buniek udržiavať ich integritu je obmedzená. Intenzívne nežiaduce podmienky, ktoré prekračujú tlmivú kapacitu bunkových ochranných systémov, vedú k ireverzibilnej poruche homeostázy, extenzívnemu poškodeniu buniek a následne k ich smrti. Nežiaduce enviromentálne podmienky ako nedostatok kyslíka i živín, zvýšená teplota, kontakt s jedmi a extenzívne mechanické preťaženie buniek sú účinnými spúšťačmi nekrózy [Hotchkiss a kol., 2009]. Jeden zo základných rozdielov v biochémii apoptózy a nekrózy spočíva v rozdieloch na energetickej úrovni. Kým nekróza je charakterizovaná kompletnou stratou energetického potenciálu bunky, apoptóza je proces aktívny, vyžadujúci energiu vo forme ATP. Medzi apoptózou a nekrozou je rozdiel nielen v požiadavkách na energiu, ale taktiež aj na morfologickej a molekulovej úrovni [Lemasters, 2007; Fabianová, 2010]. Tabuľka 1 sumarizuje rozdielne znaky a vlastnosti medzi nekrozou a apoptózou.

Tabuľka 1: Významné rozdiely v znakoch a vlastnostiach medzi nekrózou a apoptózou.

	Nekróza	Apoptóza
Morfologické zmeny	Zväčšenie resp. napučnutie cytoplazmy a mitochondrie	Scvrknutie cytoplazmy; kondenzácia jadra
	Stratenie membránovej integrity	Pľuzgiernatenie membrány, integrita zachovaná
	Celková lýza bunky	Rozpadnutie bunky na menšie formy, tvorba apoptotických teliesok
	Vyplavenie bunkového obsahu do extracelulárneho priestoru	Vyčistenie bunkového obsahu fagocytózou
Biochemické črty	Nevyžaduje energetickú závislosť; pasívny proces	Vyžaduje energiu vo forme ATP; aktívny proces
	Strata regulácie iónovej homeostázy	Pevne regulovaný proces vyžadujúci aktiváciu a enzymatické kroky
	Vznik náhodne veľkých fragmentov DNA; tvorba šmuhy na agarózovom géle	Pravidelné DNA fragmenty o rovnakých veľkostiach (cca. 200 bp)
		Uvoľnenie rôznych faktorov (cyt-c, AIF) z mitochondrie do cytoplazmy Aktivácia kaspázovej kaskády
Fyziologické vlastnosti	Ne-fyziologické narušenie (toxíny, zranenie, hypoxia, masívne tkanivové poškodenie a pod.)	Fyziologické stimuly (rastové faktory, extracelulárne signály a pod.)
	Zápal vedie k podstatnému uvoľneniu bunkového obsahu	Generovanie nezápalových odpovedí
	Postihnutá je skupina susediacich buniek; celé tkanivo	Postihnuté sú individuálne bunky
	Fagocytóza prostredníctvom makrofágov	Fagocytóza prostredníctvom susedných buniek alebo makrofágov

Morfologické črty apoptózy sú značne odlišné od morfológie nekrózy. Makroskopickými, ultraštruktúrnymi a fyziologickými znakmi apoptózy je scvrkávanie jadra, kondenzácia chromatinu, internukleozomálne štiepenie DNA, vytváranie pľuzgierikov v plazmatickej membráne a dezintegrácia bunky do množstva vezikúl, ktoré bývajú spravidla pohltené okolitými bunkami či tkanivom. Na druhej strane, nekróza je spojená s puchnutím mitochondrií, dilatáciou endoplazmatického retikula a rozsiahlou vakuolizáciou cytoplazmy. Na povrchu plazmatickej membrány sa nevytvárajú pľuzgieriky, ale bunka puchne, pričom dochádza k lýze bunky bez vzniku vezikúl. Ako bunka umiera, dochádza k narušeniu cytoplazmy, chromatin hrubne, zráža sa a táto zmena je nasledovaná stratou jadrového farbenia a karyolýzou (obr. 2).



Obrázok 2: **Ilustračný rozdiel medzi nekrózou a apoptózou.** Obrázok upravený a použitý z internetovej stránky:
<http://medicinembbs.blogspot.sk/2011/03/programmed-cell-death-apoptosis.html>

Obsah bunky je uvoľnený do medzibunkového prostredia, pričom dochádza k poškodeniu okolitých buniek a indukcii zápalu. Na rozdiel od nekrózy, apoptóza nie je spojená s poškodením okolitých buniek a vo všeobecnosti ju nesprevádza zápal. Apoptotické bunky sú obyčajne rozptýlené po celom tkanive, zatiaľ čo nekrotické bunky sú najviac lokalizované v priliehajúcich vrstvách [Hotchkiss a kol., 2009].

2.2 AUTOFÁGIA

Termín „autofágia“ bol odvodený z Grečtiny a znamená „samopožíranie“. Tento proces je charakterizovaný likvidáciou veľkého objemu cytoplazmy a organel v autofágových vččkoch a následne podstúpený degradácii pomocou vlastného lyzozomálneho systému [Ghatage a kol., 2014]. Prvýkrát ho popísal pred viac ako 45 rokmi Christianom de Duve, ktorý sledoval degradáciu mitochondrií a ostatných vnútrobunkových štruktúr na pečenejových bunkách potkana, ktoré boli vystavené pankreatickému hormónu – glukagónu [Deter a Duve, 1967]. Významnú úlohu v procese autofágie zohrávajú gény označované ako ATG (gény súvisiace s autofágiou). Na kvasinkách bolo identifikovaných 32 rozdielných génov, ale väčšina z nich sa nachádza aj u rastlín a cicavcov [Glick a

kol., 2010]. Definované sú tri typy autofágie: makro-, mikro-, a šaperónmi sprostredkovaná autofágia. Všetky typy končia proteolytickou degradáciou cytoplazmatických komponentov lyzozómami. Makro-autofágia dopravuje cytoplazmatický obsah do vnútra lyzozómov prostredníctvom dvojväzbových membránových váčkov, tiež známych ako autofagozómy, ktoré sa v lyzozómoch spájajú a vytvárajú autolyzozóm. Pri mikro-autofágii sa cytoplazmatické komponenty transportujú priamo cez membránu lyzozómov. Obidva spôsoby sú schopné pohltiť veľké štruktúry cytoplazmy pomocou selektívnych a neselektívnych mechanizmov [Glick a kol., 2010]. V šaperónmi sprostredkovanej autofágii sú cieľové proteíny translokované cez lyzozomálnu membránu v komplexe so šaperónovými proteínmi, ktoré sú rozpoznávané lyzozomálnym membránovým receptorom, označovaným ako LAMP-2A. Výsledkom je rozbalenie cieľových proteínov a ich následná degradácia [Saftig a kol., 2008].

Autofágia slúži na eliminovanie dlho-žijúcich proteínov a organelových komponentov. Predstavuje dôležitú funkciu v bunkovom systéme, ako je diferenciácia, stres alebo poškodenia indukované cytokínmi. Bunky, ktoré podstúpia neprimeranej autofágii, odumierajú neapoptotickým spôsobom bez aktivácie kaspáz. Autofágia predstavuje hlavný faktor ako pri dozrievaní, tak predchádzaní rakoviny a jej úloha môže byť rozdielna počas tumorovej progresie [Ghatage a kol., 2014].

2.3 PARAPTÓZA

Paraptóza popisuje neapoptotickú bunkovú smrť charakterizovanú prítomnosťou vakuol v cytoplazme, bez fragmentácie jadra, kondenzácie chromatinu a tvorby apoptotických teliesok. Výrazným znakom je ale progresívny opuch mitochondrií i endoplazmatického retikula na začiatku procesu a nevyžaduje si aktiváciu kaspáz. Paraptóza je spúšťaná mitogén-aktivovanými proteín kinázami, ako aj členmi TNF rodiny a receptora pre inzulín-podobný rastový faktor I [Bröker a kol., 2005].

2.4 MITOTICKÁ KATASTRÓFA

Pod mitotickou katastrofou sa rozumie ďalší typ bunkovej smrti, odlišnej od apoptózy. Počas mitózy podstupujú proliferačné bunky rôznym štrukturálnym a molekulovým zmenám (chromatínová kondenzácia, tvorba deliaceho vretienka, rozpadnutie jadrového obalu a reorganizácia cytoskeletu). Vznik mitotického vretienka pri chromozómovej segregácii je založený na bipolárnych poliach mikrotubulov. Mikrotubuly sú vysoko dynamické polyméry, ktoré sa kontinuálne predlžujú a skracujú na základe väzby regulačných proteínov. Rýchlosť polymerizácie mikrotubulov je definovaná ako

katastrófa [Vakifahmetoglu a kol., 2008]. Pojem mitotická katastrófa sa používa na vysvetlenie oneskorenej bunkovej smrti v spojení s mitózou. Predstavuje sled udalostí, ktoré majú za následok predčasný alebo nevhodný vstup buniek do mitózy, spôsobený fyzikálnym alebo chemickým stresom (ionizujúce žiarenie, protinádorové lieky). Bunky, ktoré podstúpia mitotickej katastrófe vytvoria aneuploidné bunky, ktoré pri neskoršej reprodukcii môžu predstavovať riziko onkogenézy [Ghatage a kol., 2014].

3 KĽÚČOVÉ MOLEKULY V APOPTÓZE

Súčasnými metódami sa podarilo identifikovať 4 hlavné funkčné skupiny molekúl zúčastňujúcich sa pri spúšťaní a ovplyvňovaní apoptotického procesu. Patria sem kaspázy; adaptorové proteíny, ktoré kontrolujú aktiváciu iniciátorov kaspáz; členovia super rodiny tumor nekrotizujúceho faktora (TNF) i receptora (TNF-Rc); a bielkoviny Bcl-2 rodiny [Strasser a kol., 2000].

3.1 KASPÁZY

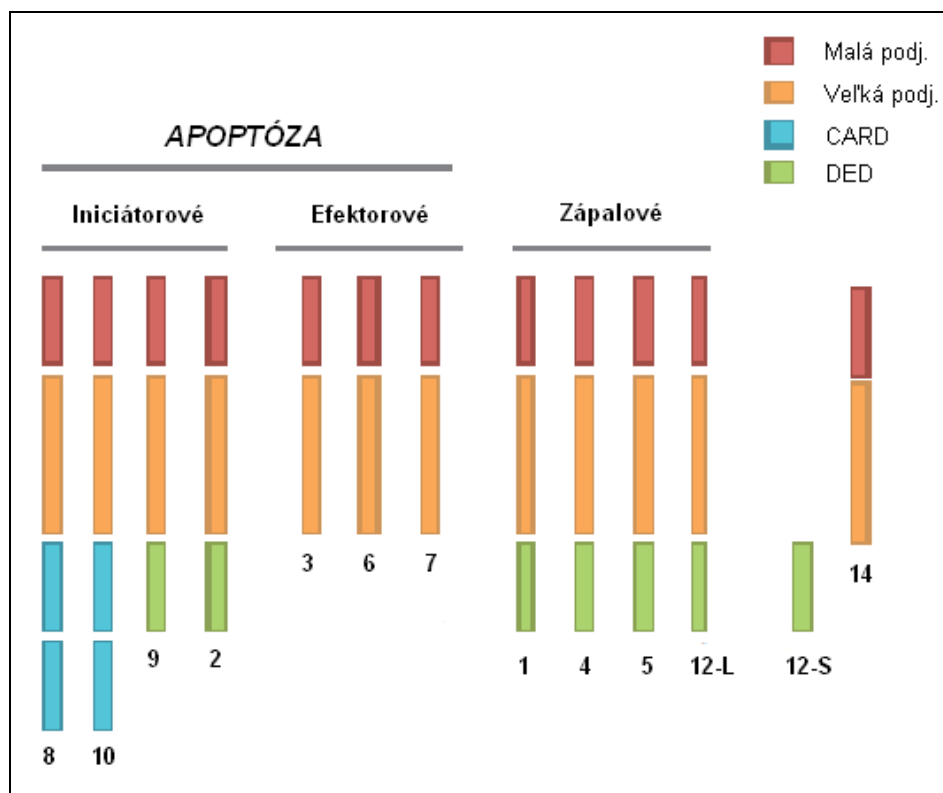
Kaspázy predstavujú skupinu cysteinových proteáz, ktoré sú nevyhnutné pri programovanej bunkovej smrti [Grütter, 2000]. Aktivita cys-proteáz bola detekovaná vo všetkých bunkách podstupujúcich apoptózu bez ohľadu na ich pôvod alebo smrteľné stimuly. Proteín Ced-3, kódujúci aspartát špecifickú cys-proteázu je potrebný pri smrti všetkých somatických buniek [Kumar, 2007]. U cicavcov bolo identifikovaných najmenej 14 kaspáz a z toho priamo iba u človeka kaspáza-1, -10 a -14 [Li a Yuan, 2008]. Tieto enzýmy rozpoznávajú tetrapeptidový motív a rozštiepujú substráty na karboxylovom mieste aspartátového zvyšku. Sú syntetizované ako zymogény, ktoré majú veľmi nízku enzymatickú aktivitu. Vytvorením dvoch identických heterodimérnych podjednotiek 2x20 kDa a 2x10 kDa vznikajú aktívne formy enzýmov [Grütter, 2000]. Individuálnosť kaspáz je poznačená odlišnou substrátovou špecifickosťou, ktorá je determinovaná pomocou opačného poradia AMK v reťazci. Niektoré kaspázy obsahujú dlhú pred-oblasť označovanú ako DED (-8 a -10) a iné zasa doménu CARD (kaspáza-1, -2, -4, -5, -9, -11 a -12), ktoré umožňujú interakcie s ďalšími proteínmi v súvislosti so signálnou dráhou [Ghavami a kol., 2009]

3.1.1 Významné kaspázy a ich mechanizmus aktivácie

Kaspázy sú syntetizované vo forme jednoduchého reťazca ako neaktívne zymogény, pozostávajúce zo štyroch domén: N-terminálnej preddoménu o variabilnej dĺžke; veľkej podjednotky s molekulovou hmotnosťou okolo 20 kDa, malej podjednotky (~10 kDa) a spojovacej oblasti pre tieto katalytické podjednotky [Salvesen a Riedl, 2008]. Výsledkom proteolytického rozštiepenia kaspázových prekursorov je veľká a malá podjednotka s produkciou hetero-tetramérneho komplexu. Tento komplex predstavuje aktívnu časť enzýmu a pozostáva z dvoch veľkých a dvoch malých podjednotiek [Wolf a Green, 1999]. Samotné kaspázy sa líšia v dĺžke a sekvencii aminokyselinovej N-terminálnej preddoménu. Dlhšia forma (pozostáva z viac ako 90 AMK zvyškov) obsahuje jednu z dvoch modulárnych oblastí nevyhnutných pre interakciu s adaptorovými proteínmi. Tieto moduly obsahujú DED alebo CARD (obr. 3). Hydrofóbne proteínové interakcie sú dosiahnuté najmä prostredníctvom

DED-DED kontaktov, pričom elektrostatické interakcie sa odohrávajú cez CARD-CARD kontakty [Ghavami a kol., 2009]. Na základe ich proapoptotickej funkcie sa kaspázy delia do dvoch skupín: iniciátorovej a efektorovej (obr. 3). Prvá skupina iniciátorových kaspáz (kaspáza-2, -8, -9, -10 a pravdepodobne aj -11) riadi druhú skupinu (kaspáza-3, -6 a -7). Naopak efektorové kaspázy sú schopné priamo degradovať mnohopočetné substráty obsahujúce štrukturálne a regulačné proteíny v bunkovom jadre, cytoplazme a cytoskelete [Wang a kol., 2005]. V niektorých prípadoch môžu aj iniciátorové kaspázy pôsobiť ako efektory, vtedy ich aktivita pomáha k zosilneniu samovražedného signálu v bunkách v ktorých bola dráha k navodeniu smrti slabo iniciovaná. Navyše aktivácie efektorových kaspáz nemusia byť zapríčinené iba iniciatorovými kaspázami, ale taktiež nekaspázovými proteázami: katepsínmi, kalpaínmi a granzýmami [Ghavami a kol., 2009].

Okrem účasti kaspáz pri vývoji apoptózy sú niektoré spájané aj s dozrievaním protizápalových cytokínov, vytvárajú tak tretiu skupinu kaspáz, zápalovú (obr. 3) [Li a Yuan, 2008]. Proteolytické kaskády kaspáz sú navzájom prepojené a to vedie k zvýšeniu ich substrátovej špecificity. V dôsledku toho môže byť apoptotický signál zosilnený. V súčasnosti existuje veľký počet vírusových a bunkových inhibítorov, ktoré môžu brániť iniciácii a amplifikácii apoptotických signálov proteolytickej kaskády [Salvesen a Riedl, 2008].



Obrázok 3: **Zloženie a rozdelenie kaspáz podľa ich funkcie.** Farebne sú vyznačené podjednotky pre jednotlivé typy kaspáz. Význam skratiek: CARD - kaspázu získavajúca doména, DED - efektorová doména smrti.

3.1.2 Substráty kaspáz

Aktivované efektorové kaspázy -3, -6 a -7 majú mnoho substrátov a proteolytické štiepenie týchto substrátov vedie ku konečnému zániku bunky [Taylor a kol., 2008]. Počet substrátov sa odhaduje na 400, aj keď u väčšiny nie je známy presný význam tohto štiepenia pre odumretie bunky. Prehľad substrátov môžeme nájsť v internetovej databáze „The Caspase Substrate dataBase Homepage“ [Lüthi a kol., 2007]. Medzi významné substráty kaspáz patria komponenty aktínových mikrofilamentov: aktín a asociované proteíny ako je myozín, spektríny, α -aktinín i filamín [Communal a kol., 2002]. Ďalej mikrotubulárne proteíny: tubulín, asociované proteíny (tau proteín), proteíny intermediárnych filamentov a jadrové lamíny. Rozštiepenie týchto proteínov má za následok oddelenie bunky od podkladu okolitých buniek a zánik cytoskeletu [Taylor a kol., 2008]. Okrem týchto štrukturálnych proteínov je štiepená celá rada ďalších, ktoré sa podieľajú na typovo dôležitých funkciách. Rozštiepením proteínu ICAD – inhibítor kaspázou aktivovanej DNázy, sa inhibuje aktivita CAD (kaspázou aktivovaná DNáza), pričom CAD bez svojho inhibítora následne katalyzuje internukleozomálne štiepenie DNA [Enari a kol., 1998]. Efektorovými kaspázami je aktivovaný proteín Mst1, ktorý v jadre fosforyluje histón H2B a navodzuje tak kondenzáciu chromatinu [Ura a kol., 2001]. V bunke je vďaka kaspázam narušená aj translácia, keďže kaspázy štiepia translačné iniciačné faktory: eIF2a, eIF3 alebo eIF4 cytoskeletu [Taylor a kol., 2008]. Efektorové kaspázy sú zodpovedné za štiepenie celej rady substrátov, majú deštruktívny vplyv na štruktúru a životné funkcie bunky. Predstavujú hlavné prostriedky k úplnému zničeniu bunky a sú zodpovedné za vznik väčšiny typických morfológických znakov, pozorovaných počas apoptózy [Šramek, 2010].

3.2 TNF A JEHO RECEPTORY

Tumor nekrotizujúci faktor (TNF) bol prvýkrát popísaný v roku 1984 ako cytokín s anti-nádorovým efektom v podmienkach *in vitro* aj *in vivo* [Lee a kol., 1984]. Odvtedy sa realizovali rozsiahle štúdie, ktoré poukázali, že poznáme najmenej 18 odlišných členov TNF super rodiny, ktoré majú spoločnú homológiu v 15 - 25% aminokyselinovej sekvencie. Skupina týchto proteínov sa viaže na odlišné receptory (TNF-Rc), ktoré majú pleiotropické pôsobenie [Gaur a Aggarwal, 2003]. V závislosti na type bunky a ďalších signálov, ktoré atakujú bunku sa môžu tieto receptory podieľať na proliferácii, prežívaní, diferenciácii alebo smrti bunky [Ashkenazi a Dixit, 1998; Blandizzi a kol., 2014]. Receptory sú aktivované skupinou štruktúrne podobných ligandov, ktoré patria k TNF rodine [Tab. 3]. Väčšina z týchto ligandov je syntetizovaných ako triméry ukotvené na membráne. Receptor pre tumor nekrotizujúci faktor superrodiny člena 6, označovaný tiež ako CD95, Fas alebo APO-1 a TNF-RI, ako aj ďalší členovia obsahujú cytoplazmatický región (DD), ktorý je nevyhnutný pre indukciu apoptózy. Členovia tejto rodiny sú niekedy označovaní aj ako receptory smrti [Strasser a kol., 2000]. Známe sú

aj ďalšie smrť-indukujúce ligandy a ich receptory v tejto rodine. TNF-apoptózu indukujúci ligand (TRAIL) spúšťa apoptózu prednostne v transformovaných bunkách a v porovnaní s ostatnými ligandami je exprimovaný v rôznych tkanivách [MacFarlane, 2003]. Pre TRAIL boli identifikované 4 receptory, ale iba DR4 a DR5 sú spomínané pri apoptóze.

Tabuľka 2: Vplyv vybraných členov TNF rodiny na apoptózu a proliferáciu.

Ligand	Receptor	Apoptóza	Proliferácia	NF-κB	JNK	P42MAPK	P38MAPK
TNF-α	TNFR1, R2	+	+	+	+	+	+
LTα	TNFR1, R2	+	+	+	+	+	+
FasL	Fas	+	-	+	+	-	-
VEGI	DR3	+	-	+	-	-	-
TRAIL	DR4, DR5	+	-	+	+	-	-
LTβ	LT-βR	+	+	+	-	-	-
CD27L	CD27	+	+	+	+	+	-
CD30L	CD30	+	+	+	+	-	-
4-1BBL	4-1BB	+	-	+	+	-	-
Tweal	Fn 14	+	+	+	+	-	-
Light	LT-βR, HVEM	+	+	+	-	-	-
CD40L	CD40	-	+	+	+	-	-
OX40L	OX-40	-	+	+	-	-	-
Rankl	Rank	-	+	+	+	+	+
April	Taci	-	+	+	+	-	-
Baff	Taci, Bcma	-	+	+	+	-	-
Gitrl	Gitrl	-	+	+	-	-	-
EDA-A1	EDAR	+	-	+	+	-	-
EDA-A2	XEDAR	-	-	+	-	-	-
?	TROY	-	+	+	-	-	-
?	DR6	-	-	+	+	-	-
?	RELT	?	+	+	?	?	?

Legenda: znamienko „+“ predstavuje pozitívnu reguláciu a znamienko „-“, negatívnu. *[upravené podľa Gaur a Aggarwal, 2003]

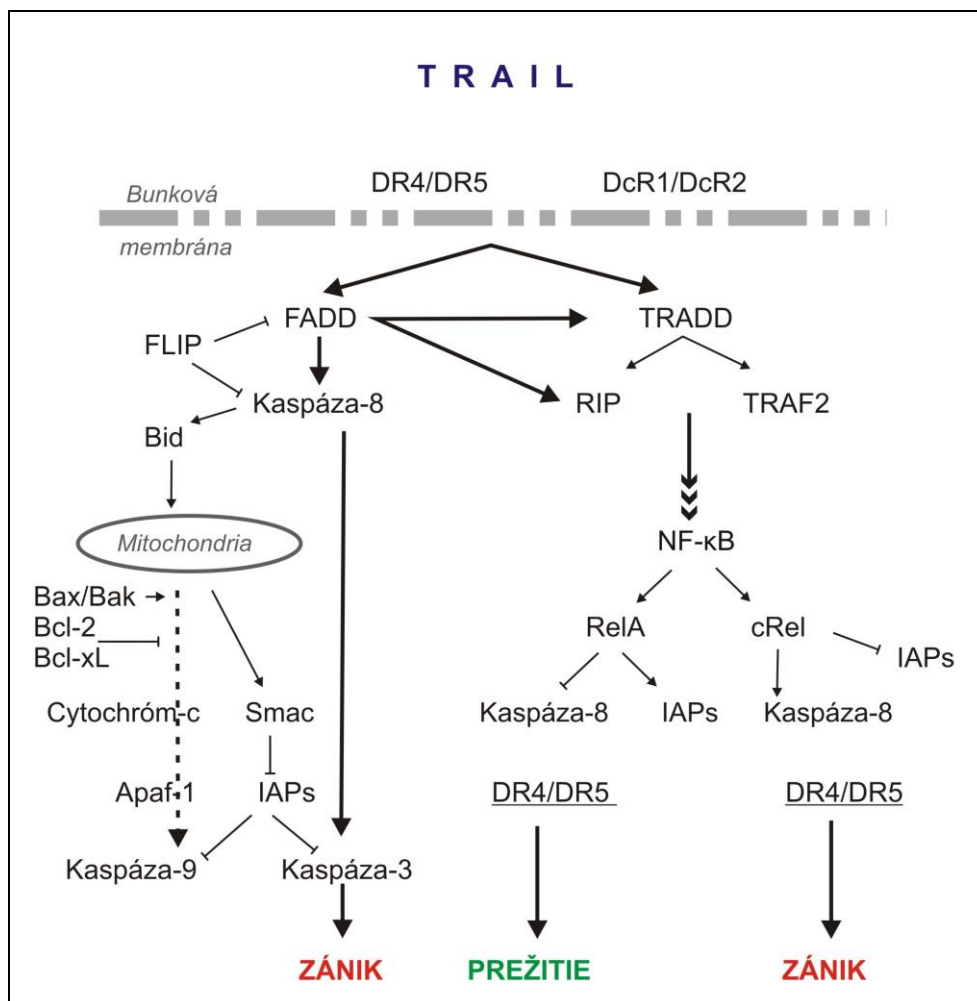
V tabuľke 2 je znázornené, že väčšina členov TNF rodiny je schopná regulovať apoptózu, proliferáciu, ako aj prežívanie a diferenciáciu buniek [Gaur a Aggarwal, 2003]. Známostou vlastnosťou cytokínov rodiny TNF je, že členovia aktivujú transkripčný faktor NF-κB. Preto členovia TNF rodiny aktivujú ako apoptotickú, tak aj anti-apoptotickú dráhu [Gaur a Aggarwal, 2003].

3.2.1 TRAIL indukovaná apoptóza a mechanizmus jej rezistencie

Ligand TRAIL, známy aj ako Apo2 ligand, je transmembránový proteín typu II, ktorého extrabunková karboxylová-terminálna časť môže byť proteolyticky uvoľnená z membránového povrchu do vezikulovej alebo rozpustnej formy [Monleón a kol., 2001]. Rovnako ako väčšina členov TNF rodiny aj TRAIL tvorí homotriméry, ktoré sa viažu na tri receptorové molekuly. TRAIL je konštitutívne exprimovaný v rôznych typoch tkanív [Wiley a kol., 1995]. TRAIL indukuje AP v rôznych transformovaných alebo nádorových bunkách, avšak nie v normálnych. Ako je známe, TRAIL spúšťa apoptózu interakciou s receptormi. V súčasnosti poznáme 6 receptorov pre TRAIL v nádorových bunkách. Iba DR4 a DR5 obsahujú smrtiacu doménu, preto ich radíme k proapoptotickým receptorom. Keď sa TRAIL naviaže na DR4 a/alebo DR5 vytvorí sa trimérna forma označovaná ako DISC, čím sa indukuje adaptórový proteín FADD a kaspáza-8 (alebo -10), čo vedie k aktivácii kaspázy-3 (obr. 4) a následnému uvoľneniu substrátov nútiacich vyvolať smrť bunky [Prasad a kol., 2014].

Kaspáza-8 je schopná štiepiť proapoptotický proteín Bid na skrátenú formu. V takejto forme sa translokuje do mitochondrie, kde podporuje uvoľnenie cyt-c prostredníctvom interakcie Bax a Bad proteínov a tým sa zosilní apoptotický signál z receptorovej dráhy smrti [Wu, 2009].

Oproti netransformovaným bunkám sú nádorové bunky oveľa citlivejšie na TRAIL-indukovanú apoptózu, čo je spôsobené zvýšenou expresiou receptorov na membránach buniek [Zhang a kol., 1999]. Avšak s identifikovaním TRAIL bol objavený aj fakt, že mRNA expresia receptorov pre TRAIL je distribuovaná ako v normálnom tak malignom tkanive so širokou variáciou [Chaudhary a kol., 1995].



Obrázok 4: **Apoptózu vyvolávajúca signálna dráha TRAIL.** Smrteľné signály, resp. signály pre zánik bunky, vznikajúce prostredníctvom TRAIL receptorov (FADD), môžu priamo aktivovať kaspázu-8 a následne kaspázu-3. Nepriamym spôsobom aktivujú proteín Bid, ktorý je translokovaný do mitochondrie a spôsobí uvoľnenie cytochrómu-c a Smac aktivátora do cytoplazmy. Uvoľnený cytochróm-c interaguje s apoptotickým proteázomovým aktivačným faktorom-1 (Apaf-1) a tým spôsobí aktiváciu kaspázy-9. Aktivátor Smac blokuje inhibítory apoptózy (IAPs) a tým zabraňuje ich väzbe na kaspázu-9 a -3. Smrteľný receptor apoptotickej dráhy indukovaný pomocou TRAIL (TRADD) môže aktivovať aj nukleárny faktor kappa-B. Rozdielne podjednotky NFκB určujú, či bude bunka smerovať k zániku (apoptóze), alebo prežije. Upravené podľa Zhang a Fang, 2005.

3.3 PROTEÍNY BCL-2 RODINY

Členovia rodiny Bcl-2 (B bunkového lymfómu-2) sú kategorizované do dvoch skupín. Prvá obsahuje antiapoptotické (aAP) proteíny s vysokou štruktúrnou a funkčnou homológiou Bcl-2, proteíny druhej skupiny majú nižšiu homológiu a prejavujú sa proapoptotickou aktivitou. Druhá skupina sa rozdeľuje na dve podskupiny proteínov: BAX (Bcl-2 asociovaný proteín X) a výhradne-BH3 proteíny.

Štruktúra medzi členmi rodiny je charakterizovaná od jedného do štyroch regiónov (tab. 3), ktoré sa podieľajú na vysokej homológii Bcl-2 sekvencie. Sú označované ako BH „Bcl-2 Homology

region“ domény (BH1, BH2, BH3 a BH4). Genetické analýzy odhalili, že BH domény sú dôležité ako pre funkciu, tak aj pre heterodimerizáciu medzi jednotlivými členmi rodiny [Gross a kol., 1999]. Medzi smrť-promočnými a smrť-inhibičnými proteínmi sú dôležité interakcie, ktoré určujú náchylnosť buniek k rôznym apoptotickým stimulom [Oltvai a Korsmeyer, 1994]. Navyše väčšina členov obsahuje hydrofóbne transmembránové domény, ktoré sú pravdepodobne zodpovedné za ich membránovú lokalizáciu.

Tabuľka 3: Rozdelenie proteínov Bcl-2 rodiny podľa prítomných domén.

BH domény	Proteíny
BH1-BH2-BH3-BH4	Bcl-2, Bcl-2A1, Bcl-2L1, Bcl-2L2, Bcl-2L10, Bcl-2L13
BH1-BH2-BH3	Mcl-1, Bak-1, Bax, Bok
BH1-BH2-BH4	Boo / Diva
BH2-BH3	Bcl-2L14, Bfk, Bcl-2L12
BH3	Bad, Bid, Hrk, Bcl-2L11, Bnip, Bik, Blk, Pmaip1, Map-1, Bmf, Bbc3

Antiapoptotické gény boli spočiatku lokalizované hlavne vo vonkajšej mitochondriálnej membráne. Ďalej boli tiež detegované v membránach endoplazmatického retikula (EDPR) a jadre [Nguyen a kol., 1993; De Jong a kol., 1994]. Ich hlavnou úlohou je stabilizovať mitochondriálnu membránu, zabránením uvoľnenia cytochrómu c (cyt-c) a jeho následnou väzbou na apoptózu aktivačného faktora-1 (Apaf-1)[Yang a kol., 1997]. Naopak, proapoptotickí členovia Bcl-2 rodiny sú v zdravých bunkách lokalizované v cytoskelete. Pri podstúpení signálom smrti zvyčajne interagujú s aAP proteínmi, čoho výsledkom je ich inhibícia a tým iniciácia apoptotickej mašínérie [Thomadaki a Scorilas, 2006].

Antiapoptotické proteíny sú oproti proapoptotickým proteínom oveľa viac chránené (konzervované) na základe obsahu BH domén, ktoré sprostredkujú ich intracelulárnu lokalizáciu v cytoplazmatickej membráne. Najčastejším znakom všetkých Bcl-2 proteínov je BH3 doména. Táto amfipatická α -helikálna doména zohráva ústrednú úlohu pri heterodimerizácii a smrť určujúcej aktivite [Gross a kol., 1999]. Tento koncept je posilnený existenciou celej subkategórie proapoptotických génov označovaných ako „BH3-domain-only“, ktoré pozostávajú výhradne z domény BH3.

3.3.1 Proteíny antiapoptotickej skupiny

Medzi najvýznamnejšie aAP proteíny rodiny Bcl-2 u cicavcov patrí Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-2A1, Mcl-1 a Bcl-b [Youle a Strasser, 2008]. U všetkých týchto proteínov sú zastúpené všetky 4 BH domény. Antiapoptotické proteíny (tab. 4) zabráňujú apoptóze tým, že vytvárajú s proteínmi Bax, Bak a Bok nefunkčné heterodiméry [Zha a kol., 1996a]. Hydrofóbny žliabok na ich povrchu, ktorý je tvorený doménami BH1, BH2 a BH3 interaguje nekovalentne s BH3 doménou Bak, Bad a Bim, z čoho vyplýva, že týmto spôsobom dimerizujú aAP proteíny s výhradne BH3 proteínmi a multidoménovými proteínmi z rodiny Bcl-2 [Gao a kol., 2005]. Táto heterodimerizácia aAP s Bax, Bak a Bok bráni proteínom oligomerizovať vo vonkajšej mitochondriálnej membráne. Skoro všetky Bcl-2 homológne anti-apoptotické proteíny obsahujú aj transmembránovú doménu, preto sú často zakotvené v membránach jadra, endoplazmatického retikula a predovšetkým mitochondrie. Bcl-xL, Bcl-w a Mcl-1 sa môžu čiastočne vyskytovať aj v cytosóle, odkiaľ sú do mitochondrie translokované až v priebehu apoptózy [Šrámek, 2010].

Tabuľka 4: Rozdelenie proteínov Bcl-2 rodiny podľa ich funkčnosti.

PROAPOPTOTICKÉ		ANTIAPOPTOTICKÉ
s BH-3 doménou	s multidoménou (BH)	Bcl-2
Bik	Bax	Bcl-xL
Bad	Bak	
Bim	Bok	Bcl-W
Hrk	Boo	
Hr	Bcl-B	Mcl-1
NOXA	Bcl-RAMBO	
PUMA	Bcl-xS	Bfl-1
+ ďalšie		+ vírusové homológy

Bcl-2

Bcl-2 je protoonkogén, ktorý bol identifikovaný pri chromozomálnej translokácii medzi chromozómom 14 a 18 t(14;18) u B-bunkového non-Hodgkin lymfómu [Cleary a kol., 1986]. Pri tumorigenéze zabraňuje bunkovej smrti tým, že zvyšuje mieru bunkového delenia vo fáze G0/G1. Proteínový produkt o veľkosti 26kDa pozostáva z 239 aminokyselín s jednou vysoko hydrofóbnou doménou na C-konci, ktorá je najviac lokalizovaná vo vonkajšej mitochondriálnej membráne [Haldar a kol., 1994]. Proteín obsahuje všetky 4 domény (BH1-BH4). BH1, BH2 a BH3 tvoria hydrofóbnu štrbinu, ktorou proteín interaguje s proapoptotickými členmi Bcl-2 rodiny formovaním homo- a heterodimérov.

Bcl-2 nájdeme vo veľkom množstve fetálnych tkanív, zatiaľ čo u dospelých je jeho expresia obmedzená na rýchlo sa deliace a diferencujúce bunky [Kirkin a kol., 2004]. Expresia proteínov inhibujúcich apoptózu je indukovaná rôznymi stimulmi, ako napríklad chemoterapeutikami, neuronálnym rastovým faktorom alebo glukokortikoidmi. Je dokázané, že Bcl-2 zamedzuje narušeniu mitochondriálnej membrány a uvoľneniu cyt-c, neskôr spojením s Apaf-1 inhibuje aktiváciu kaspázy 9, čím následne blokuje iniciáciu proteolytickej kaskády [Yang a kol., 1997]. Ak dôjde k fosforylácii Bcl-2 proteínu, sprostredkovanej buď Ras, Raf alebo mitogén aktivujúcou proteín kinázou (MAP), stratí svoju antiapoptotickú aktivitu [Haldar a kol., 1995].

Nadmerná expresia Bcl-2 bola zistená v nádoroch prostaty, hrubého čreva, pľúc, prsníka, žalúdka a obličiek, neuroblastóme, non-Hodgkinovom lymfóme, akútnej i chronickej leukémii a kožných malignitách (tab. 5) [Thomadaki a Scorilas, 2006]. Nadmerná expresia *Bcl-2* génu je spájaná s rezistenciou na chemoterapeutiká a radiačnú liečbu [Chauhan a kol., 2012; Gurlek a kol., 2013]. Vysoká produkcia Bcl-2 je spájaná aj s akútnou myeloidnou leukémiou typu M0 a M1, pričom sa potvrdil vzájomný vzťah medzi rezistenciou na chemoterapeutiká a poklesom kompletnej remisie ochorenia na kratšie prežívanie [Tothova a kol., 2002].

V bunkách lymfómov je účasť Bcl-2 proteínu v karcinogenéze čiastočne regulovaná fosforyláciou alebo defosforyláciou [Murata a kol., 1997]. Fosforylácia Bcl-2 na Ser70 podporuje jeho antiapoptotickú funkciu, zatiaľ čo fosforylácia na iných miestach, pozorovaná počas terapie liečivami ničiacimi mikrotubuly (napr. taxol), inhibuje jeho antiapoptotickú činnosť [Deng a kol., 2001].

Tabuľka 5: Výskyt Bcl-2 proteínov pri nádorových chorobách.

SYMBOL PROTEÍNU	TYP NÁDOROVÉHO POSTIHNUTIA
Bcl-2	Non-Hodgkinov folikulárny B-bunkový lymfóm, nádory prostaty, hrubého čreva, pľúc, prsníka, žalúdka a obličiek, neuroblastóm, akútna a chronická leukémia a kožné nádory
Bcl-X	Lymfómy, nádory obličiek, vaječníkov, prsníkov, hrubého čreva, pankreasu a hepatocelulárny karcinóm, nádory mozgu
Bad	Kolorektálny karcinóm, B-bunkový lymfóm
Bid	Chronická myelomonocytová leukémia
Bax	T-bunkový lymfóm, nádory prsníka, pľúc, lymfoblastová leukémia, nádory GITu, glioblastóm
Bak1	Kolorektálny karcinóm, nádory žalúdka, kože, karcinóm krčka maternice, nádory štítnej žľazy, prsníka, pľúc, lymfatického systému, glioblastóm
NOXA	Nádory močového mechúra
PUMA	Nádory hlavy a krku, pľúc, hrubého čreva a rekta
Bim	B-bunková leukémia
Bik	Nádory prsníka, kolorekta
Mcl-1	Nádory prsníka, kolorekta

Prevzaté z dizertačnej práce: E. Fabianová - Apoptóza vo vzťahu k rozvoju nádorových ochorení a rezistencii nádorov na cytostatiká; 2010.

Bcl-x (Bcl-2L1)

Bcl-x gén podlieha alternatívnemu zostrihu a doteraz boli identifikované tri varianty: krátka forma (Bcl-xS), dlhá forma (Bcl-xL) a gama forma (Bcl-xy) [Von Ahsen a kol., 2000]. Krátka a dlhá forma vykazujú výrazné funkčné rozdiely. Proteín Bcl-xL je tvorený dvomi centrálnymi helixami ($\alpha 5$ a $\alpha 6$), ktoré navyše obklopujú z jednej strany helixy $\alpha 1$ a $\alpha 2$ a z druhej strany $\alpha 3$ a $\alpha 4$. Tieto helixy sú prepájané dlhými slučkami. Bcl-xL má aAP charakter, je exprimovaný hlavne v dlho prežívajúcich bunkách (napr. bunky nervového systému) a lokalizovaný na perinukleárnom obale a mitochondriálnej membráne. Naopak, Bcl-xS sa exprimuje v bunkách s vysokým koeficientom obratu (napr. bunky imunitného systému) a patrí medzi aktivátory apoptózy. Tento proteín pravdepodobne negatívne reguluje proteíny Bcl-2 a Bcl-xL a na rozdiel od membránovo viazaného proteínu Bcl-xL je to proteín cytosolový [Krajewski a kol., 1994; Droin a Green, 2004].

Značná expresia *Bcl-x* je v mozgu, obličkách, týmuse a fyziologickej mliečnej žľaze, kde jeho expresia pokračuje aj počas prvého a tretieho trimestra tehotenstva, v období laktácie je znížená a opäť stúpa počas involúcie mliečnej žľazy [Hamnér a kol., 1999; Colitti, 2012].

Bcl-xL, tak ako ostatné členy Bcl-2 rodiny, reguluje apoptózu interakciou s proapoptotickými proteínmi a ich spôsobom blokácie. Tento proteín môže usmerňovať prežívanie buniek regulovaním permeability intracelulárnych membrán, zamedzením presunu cyt-c do cytosólu a zachovaním celistvosti membrány [Thomadaki a Scorilas, 2006]. Dokázaná je cesta inhibície apoptózy formovaním heterodiméru s Bax proteínom v cytosóle, čiže nezávislej na proteíne Bcl-2. Potvrdzujú to aj štúdie na niektorých typoch nádorov, kde našli zvýšenú hladinu Bcl-xL oproti nízkej Bcl-2 [Haynik a Prayson, 2006; Ma a kol., 2010]. Významné zistenie ohľadom rozdielov Bcl-xL proteínu sa prikladajú v spojitosti s rozdielnym typom patologického „gradeingu“. Castilla a kolektív [2006] zistili koreláciu hladín expresie Bcl-xL s Gleasonovým skóre a metastazovaním ľudskej rakoviny prostaty. Ďalšia štúdia vedcov Ma a kolektív [2010] objavila zvýšené hladiny Bcl-xL ako na úrovni mRNA, tak aj proteínovej v súvislosti s diferenciáciou endometriálneho tkaniva. Expresia Bcl-xL korelovala s vývojom jednoduchej a atypickej hyperplázie tkaniva, ako aj s patologickým stupňom endometriálneho karcinómu. Preto Bcl-xL zohráva významnú úlohu pri patogenéze nádorov ako anti-apoptotického faktora, čo potvrdzujú aj štúdie kde bola úroveň proteínu vysoká pri rezistencii na chemoterapiu [Williams a kol., 2005; Reeve a kol., 1996]. Znížená regulácia *Bcl-xL* génu je v úzkom vzťahu s expresiou c-Myb a predstavuje užitočný prognostický znak pre kolorektálny karcinóm [Biroccio a kol., 2001].

Bcl-xS vyvoláva apoptózu väzbou na hydrofóbnu zložku Bcl-2 alebo Bcl-xL, čím blokuje ich antiapoptotickú aktivitu. Expresiu *Bcl-X* génu nadregulujú glukokortikoidy, žiarenie, IL-3, inzulínu podobný rastový faktor 1 (IGF-1) a PI3K.

Proteín Bcl-x je u ľudí vo zvýšenej miere produkovaný v prípade rôznych malignít, ku ktorým radíme lymfómy, nádory prsníkov, hrubého čreva, pankreasu, hepatocelulárny karcinóm, renálne a ovariálne nádory (tab. 5) [Gobe a kol., 2002; Watanabe a kol., 2002; Jaafar a kol., 2012].

Mcl-1

cDNA *Mcl-1* (myeloid cell leukemia 1) má dĺžku okolo 3,8 kb a kóduje proteín s molekulovou hmotnosťou 37,3 kDa s 350 AMK zvyškami. Gén pozostáva z 3 exónov, 2 intrónov a netranslačnej oblasti o veľkosti 370 bp [Akgul a kol., 2000].

Expresia *Mcl-1* je úzko regulovaná na transkripčnej, post-transkripčnej a post-translačnej úrovni. Počas post-transkripčnej regulácie môže dochádzať pomocou alternatívneho zostrihu k produkcii krátkej formy Mcl-1S. Táto forma sa prejavuje podobnými vlastnosťami ako BH-3 proteíny, čiže má proapoptotickú aktivitu, na rozdiel od dlhej formy Mcl-1L [Thomadaki a Scorilas, 2006].

3.3.2 Proapoptotické multidoménné proteíny

Multidoménné pAP cicavčie proteíny obsahujú tri BH domény, neobsahujú však doménu BH4 [Youle a Strasser, 2008]. Bax, Bad aj Bok prispievajú k aktivácii kaspáz prostredníctvom ich pôsobenia na vonkajšiu mitochondriálnu membránu. V priebehu apoptózy sa Bax premiestňuje z cytosólu do vonkajšej MIT membrány. Bak sa nachádza priamo vo vonkajšej MIT membráne, kde môže byť viazaný na Mcl-1 a Bcl-xL [Shimazu a kol., 2007]. Počas apoptózy je Mcl-1 degradovaný alebo je jeho väzba s Bak prerušená pôsobením výhradne BH3 proteínu Noxa, Bim alebo Bik. Proteín Bok vytvára selektívne heterodiméry s Mcl-1, ale neinteraguje s ostatnými aAP proteínmi Bcl-2, Bcl-xL a Bcl-w. Ľudský Bok je lokalizovaný v cytosóle i v membránach mitochondrií, kde oligomerizuje. K tomuto javu prispievajú opäť výlučne BH3 proteíny a preto sa Bok svojim pôsobením podobá proteínu Bax [Šramek, 2010].

Bax

Bax je prvý identifikovaný proapoptotický člen Bcl-2 rodiny, ktorý bol objavený ako proteín viažuci sa s Bcl-2 v imunoprecipitačných štúdiách [Oltvai a kol., 1993]. Bax je tumor supresor, čo znamená, že jeho funkciou je vyvolať programovanú smrť nadbytočných alebo poškodených buniek, čím prispieva ku tkanivovej homeostáze. Koncentrácia Bax je preto v nádorových bunkách znížená a vo väčšine prípadov sprevádzaná mutáciou génu *p53*. Keďže transkripcia génu *Bax* je spúšťaná proteínom *p53*, niektoré missense mutácie génu *p53* môžu dramaticky znížiť hladinu Bax v nádorových bunkách [Kaneuchi a kol., 1999]. V nádoroch prsníka sa po vykonaní analýz mutácií génov zistili mutácie génu *p53*, pričom gén *Bax* mutácie neobsahoval [Sturm a kol., 2000]. Posunová mutácia na *Bax* géne bola nájdená v T-bunkách akútnej lymfoblastovej leukémie a v endometriu [Marone a kol., 2000]. Vo všetkých prípadoch gastrointestinálnych nádorov boli nájdené dve charakteristické mutácie *Bax* génu [Gil a kol., 1999]. Novšia analýza Bax génu medzi skupinou normálnych a nádorových tkanív prsníka zistila až 4 izoformy (α , d, δ , ζ), pričom izoformy d a δ spájali s rizikovým faktorom vzniku nádoru prsníka [Kholoussi a kol., 2014]. Tieto mutácie sú funkčné, preto blokujú proapoptotickú aktivitu proteínu a prispievajú k rozvoju karcinogenézy.

3.3.3 Výhradne BH3 proteíny

Skupina výhradne BH3 proteínov predstavuje u cicavcov osem členov [Strasser, 2005]. Ide o proteíny Bid, Bad, Bim, Bik, Bmf, Noxa, Puma a Hrk. Tieto proteíny zdieľajú s ostatnými Bcl-2 proteínmi iba jednu spoločnú doménu, BH3. Predstavujú skupinu rozmanitých molekúl, ktoré nepatria medzi homológy proteínov Bcl-2 (s výnimkou Bid). Okrem toho, že Bid dokáže oligomerizovať a permeabilizovať membrány, odlišuje sa aj tým, že môže byť štiepený kaspázou-8, ktorá je súčasťou skôr vonkajšej AP dráhy. Proteín Bid vytvára svojim pôsobením v bunke spojenie medzi vonkajšou a vnútornou apoptotickou dráhou [Šramek, 2010].

Všetky BH3 proteíny sú proapoptotické a ich význam spočíva v tom, že fungujú ako senzory najrôznejších pAP signálov. Rôzne fyziologické stresy a signály sa prenášajú ďalej prostredníctvom týchto pAP proteínov. Ich expresia je často riadená transkripčnými faktormi. Napr. expresia Noxa, Puma a v menšej miere aj Bid, je vyvolaná transkripčným faktorom p53, ako odpoveď na poškodenie DNA [Nakano a Vousden, 2001; Sax a kol., 2002]. Proteíny BH3 sú často aktivované prostredníctvom rozmanitých úprav a mechanizmov. Bid je premenený proteolytickým štiepením kaspázou-8 na aktívny proteín tBid. Bad je často inhibovaný v dôsledku fosforylácie jeho BH3 domény, kde sa na takto pozmenenú doménu viaže 14-3-3 proteín, ktorý ho svojou väzbou inaktívuje [Zha a kol., 1996]. Fosforylácia prebieha ako odpoveď na prítomnosť rastových faktorov. Pokiaľ sa však bunka ocitne v prostredí, kde je rastových faktorov veľmi málo, fosforylácia Bad sa zastavuje a tento proteín sa stáva aktívnym. Bim je aktivovaný uvoľnením z dyneínu (mikrotubulový proteín) alebo zníženou úrovňou jeho fosforylácie, pričom fosforylácia Bim má za následok uvoľnenie z aktín-myozinového komplexu. Proteín označovaný ako HRK (Harakiri, Bcl-2 interaktívny proteín) prispieva k apoptóze neurónov v dôsledku nedostatku rastových faktorov a Bik je aktivovaný neznámym mechanizmom v dôsledku zablokovania proteosyntézy. BH3 proteíny sú umiestnené na najrôznejších miestach bunky, sú schopné reagovať na rozmanité signály a v dôsledku svojej aktivácie sú schopné tieto signály ďalej prenášať a prispievať k integrácii týchto signálov v mitochondriách [Šramek, 2010].

Akonáhle sú BH3 proteíny aktivované, interagujú s aAP Bcl-2 proteínmi [Kim, 2006]. Niektoré z nich, ako napr. Bim, tBid a Puma sa viažu na všetky aAP proteíny z rodiny Bcl-2, zatiaľ čo Bad a Noxa dokážu interagovať iba s určitými pAP proteínmi. Bad interaguje s Bcl-2, Bcl-xL a Bcl-w, zatiaľ čo Noxa s Mcl-1. Prostredníctvom svojich domén sa viažu na aAP proteíny, čím zabraňujú aAP proteínom vytvárať heterodiméry s Bak, Bax alebo Bok [Šramek, 2010].

3.4 ADAPTOROVÉ PROTEÍNY

Adaptorové proteíny hrajú kritickú úlohu pri regulácii pro- a anti-AP signálnych dráh po následnej aktivácii receptorov smrti. Predstavujú spojenie medzi efektormi bunkovej smrti, kaspázami, receptormi bunkovej smrti a členmi proteínov Bcl-2 rodiny. Tieto prepojenia formujú asociácie medzi členmi vybraných tried molekúl charakteristických homotypickými interakciami ako sú: doména pre smrť (DD), efektorová doména smrti (DED) a kaspázu získavajúca doména (CARD) [Strasser a kol., 2000].

Po spojení s ligand-viažúcim receptorom adaptorové proteíny získavajú prokaspázu-8 alebo -10 prostredníctvom ich domény DED pre vytvorenie smrť indukujúceho signalizačného komplexu, DISC. Formovaním tohto komplexu sa spúšťa kaspázová kaskáda, čo v konečnom dôsledku vyvoláva apoptózu. Ďalšie adaptórové proteíny sprostredkujú apoptotickú kaskádu odlišným mechanizmom. S prokaspázou-2 sú spájané 2 proteíny CRADD/RAIDD (kaspáza a RIP adaptor s doménou DD) a PIDD (p53-indukujúci proteín s doménou DD, ktoré vyvolávajú DNA poškodenie cez komplex označovaný ako „PIDDosome“. Tvorba tohto komplexu vedie k štiepeniu a aktivácii kaspázy-2 [Janssens a Tinel, 2012].

Ďalšie dva proteíny, DAXX (proteín asociovaný s doménou smrti) a RIP1 (receptorový interagujúci proteín 1), obsahujú DD doménu, ktorá je prijímana FAS alebo TNF-R1 ligandovou väzbou. Tieto dva proteíny sa podieľajú na kaspázach-nezávislej AP signálnej dráhe.

Doména DD je oblasť v cytoplazmatickej časti CD95, patriacej do rodiny TNF-R. Taktiež je súčasťou adaptorových molekúl, akými sú FADD, TNF-R1 associated death domain (TRADD) a receptor interagujúci proteín (RIP). Po štiepení člena TNF-R rodiny sa na základe homotypických interakcií stávajú tieto domény adaptorom pre kaspázovú agregáciu a aktiváciu [Strasser a kol., 2000].

3.5 ĎALŠIE VÝZNAMNÉ MOLEKULY V ROZVOJI APOPTÓZY

3.5.1 p53

Tumor supresorový proteín p53 predstavuje centrálnu molekulu pri kontrolovaní bunkového cyklu. Nachádza sa v sieti bunkových reakcií, ktoré chránia genómovú integritu, indukujú apoptózu, regulujú glykolýzu i autofágiu a dokonca podporujú aj diferenciáciu buniek [Amaral a kol., 2010]. Vo všeobecnosti je proteín p53 označovaný za tumor supresorový transkripčný faktor, ktorý je v zdravých bunkách udržiavaný v nízkych koncentráciách. Proteín p53 je veľmi silno regulovaný a obsahuje viacero rôznych miest, kde môže byť fosforylovaný/defosforylovaný [Liang a kol., 2013]. Zapojenie signálnej p53 dráhy pri apoptóze je závislé od širokej škály stresorov, ktoré ju stabilizujú alebo ovplyvňujú cez post-translačné modifikácie. Za prvý kľúčový bod stabilizácie je považovaná klasická fosforylácia. Existuje nesmierne veľké množstvo kináz (ATM, Chk1/Chk2, JNK, p38, atď.), zodpovedných za fosforyláciu p53. Aktivácia p53 môže viesť k zástave bunkového cyklu a za určitých okolností môže táto aktivácia viesť k apoptotickej bunkovej smrti. Po deaktivácii signálu je proteín opäť defosforylovaný a prestane fungovať. Ubiquitinácia a acetylácia lyzínových zvyškov sú vzájomne sa vylučujúce modifikácie. Nakoniec aj metylácia, sumoylácia a neddylácia sú tiež spájané s reguláciou stability a transkripčnej aktivity p53. Aktivovaný vytvára dimér, ktorý funguje ako transkripčný faktor, spúšťajúci transkripciu rôznych génov. Jedná sa najmä o proteíny zúčastňujúce sa kontroly bunkového cyklu (p21), mitochondriálnej apoptózy (Bax, Bid) a opravy DNA (GADD45) [Haupt a kol., 2003]. Okrem toho, že p53 spúšťa transkripciu proapoptotických proteínov esenciálnych pre mitochondriálnu apoptózu (Bax a Bid), dochádza k translokácii p53 do mitochondriálnej membrány, kde sa viaže na antiapoptotickú bielkovinu Bcl-xL, čím významne napomáha rozvoju mitochondriálnej apoptózy [Mihara a kol., 2003]. Schopnosť integrácie p53 do každého typu post-translačnej modifikácie umožňuje adekvátnu odpoveď cez moduláciu expresie rôznych podskupín cieľových génov [Riley a kol., 2008].

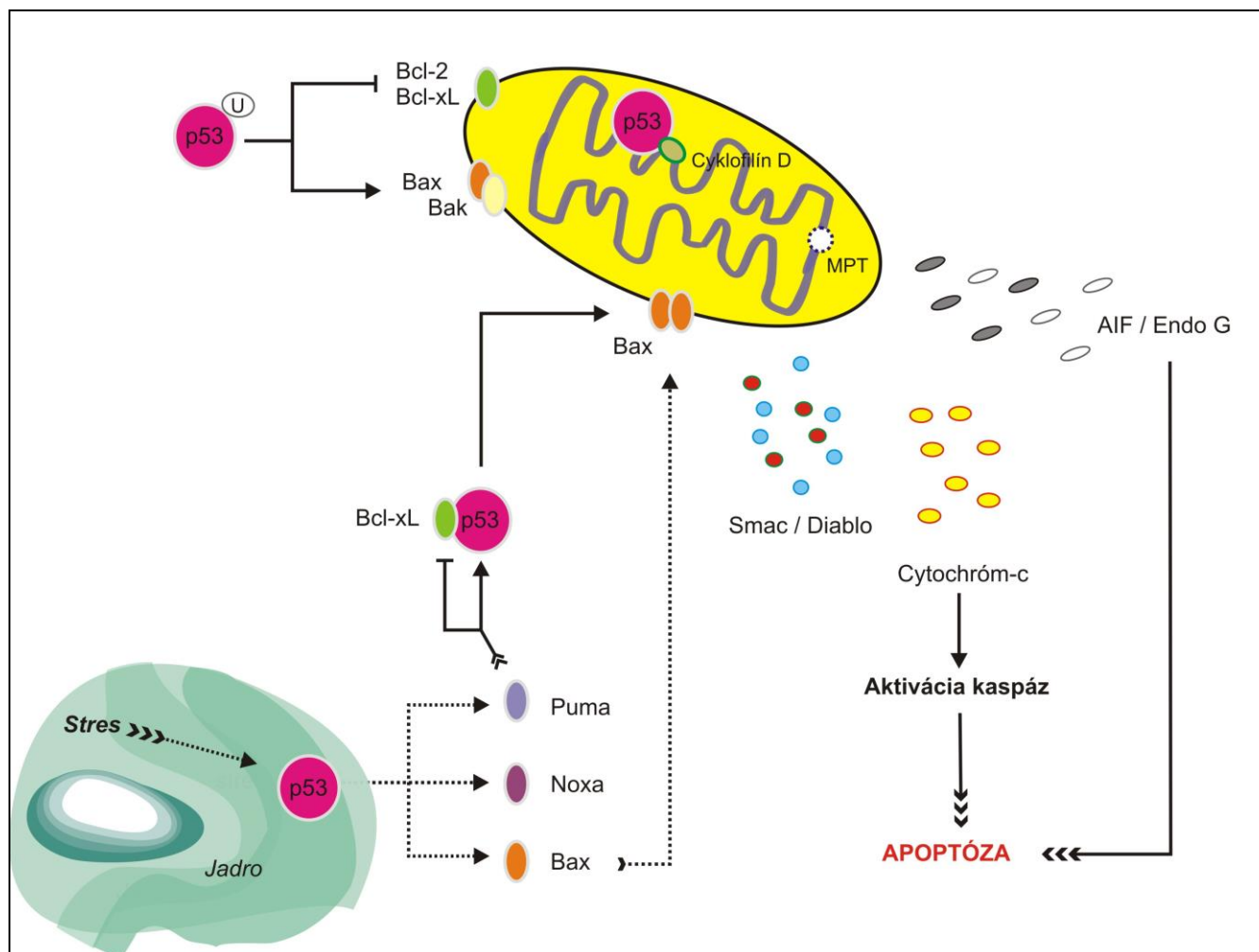
Strata funkčnosti proteínu p53 vedie pri väčšine nádorových postihnutí ku genómovej nestálosti, zníženej regulácii bunkového cyklu a inhibícii apoptózy. Pri poškodení DNA, p53 udržiava bunku v kontrolnom bode až pokiaľ nie je poškodenie opravené. V prípade neodvratného poškodenia sa najmä vďaka p53 automaticky spúšťa apoptóza [Amaral a kol., 2010].

V tumoroch môže dôjsť k zastaveniu oboch apoptotických dráh (vnútornej aj vonkajšej) rôznymi mechanizmami. Veľmi často mutovaným génom v patogenéze tumorov je práve hlavný mediátor vnútornej dráhy, p53. Mutácie p53 a ich impakt na rozvoj a charakter rôznych typov nádorových ochorení je prehľadne zdokumentovaný v databáze OMIM: (<http://omim.org/entry/191170>).

Taktiež aj dysregulácia mnohých ďalších génov negatívne zasahuje do funkcie *p53*, čím uľahčuje onkogenézu. Vyradenie *p53* vedie k redukcii senzitivity na žiarenie alebo chemoterapiu a ku akcelerácii rozvoja nádoru [Liang a kol., 2013].

Mechanizmus p53-závislej apoptózy

Jednou z najviac dramatických reakcií na aktiváciu *p53* je indukcia apoptózy. Bunková smrť realizovaná cez *p53*-závislú apoptózu je typicky vyvolaná mitochondriálnou dráhou, hoci sa môže konať aj prostredníctvom membránových receptorov. Ukazuje sa, že *p53*-závislá dráha je primárne závislá na transkripčnej aktivácii. Proteín *p53* má schopnosť aktivovať transkripciu rôznych proapoptotických génov, hlavne rodiny Bcl-2 (obr. 5). Dôležitosť bielkovín Puma a Noxa pri *p53* sprostredkovanej apoptóze sa ukázala pri *p53* knokautovaných myšiach, kedy bola apoptotická dráha úplne zastavená [Jeffers a kol., 2003]. Alternatívnym spôsobom môže *p53* potláčať AP cez antiapoptotické proteíny, príkladom je Survivin, čím dochádza k aktivácii kaspáz [Hoffman a kol., 2002].



Obrázok 5: **Cytosólová a mitochondriálna apoptotická dráha p53.** Jadrový p53 v cytosólovej apoptotickej dráhe indukuje expresiu Puma proteínu, ktorý v cytoplazme uvoľňuje p53 z väby na Bcl-xL. Následne uvoľnený proteín p53 navodí Bax oligomerizáciu a mitochondriálnu translokáciu. Nahromadenie p53 v cytosóle dôsledkom intracelulárneho transportu alebo stabilnej monoubiquitinácie predstavuje hlavný mitochondriálny obsah. V mitochondriách p53 vyvoláva Bax a Bak oligomerizáciu, ďalej pôsobí proti Bcl-2 a Bcl-xL a vytvára komplex s cyklofilínom D vo vnútornej MIT membráne. Tieto zmeny vedú k výraznému narušeniu mitochondriálnej membrány a následne uvoľňujú ako rozpustné tak nerozpustné apoptogenické faktory. MPT, mitochondriálny permeabilný prechod; U, ubiquitín. Upravené podľa: Amaral a kol., 2010.

Nadexpresia p53 transkripčne zvyšuje úroveň Fas receptora na povrchu buniek tak, že podporuje jeho tvorbu z Goldiho aparátu [Bennett a kol, 1998]. Jeho pôsobenie na receptorovú dráhu apoptózy je spájané aj s aktiváciou domény DR5 pre receptor TRAIL. Doména DR5 je indukovaná pri odpovedi na poškodenie DNA a na druhej strane podporuje bunkovú smrť prostredníctvom kaspázy-8. Gény pre pAP proteíny (Bid alebo PIDD) sú taktiež transkripčným cieľom p53. Dôležité je spomenúť fakt, že aj p53 proteín sa podieľa na aktivácii apoptozómu cez indukciu Apaf-1 expresie [Moroni a kol., 2001].

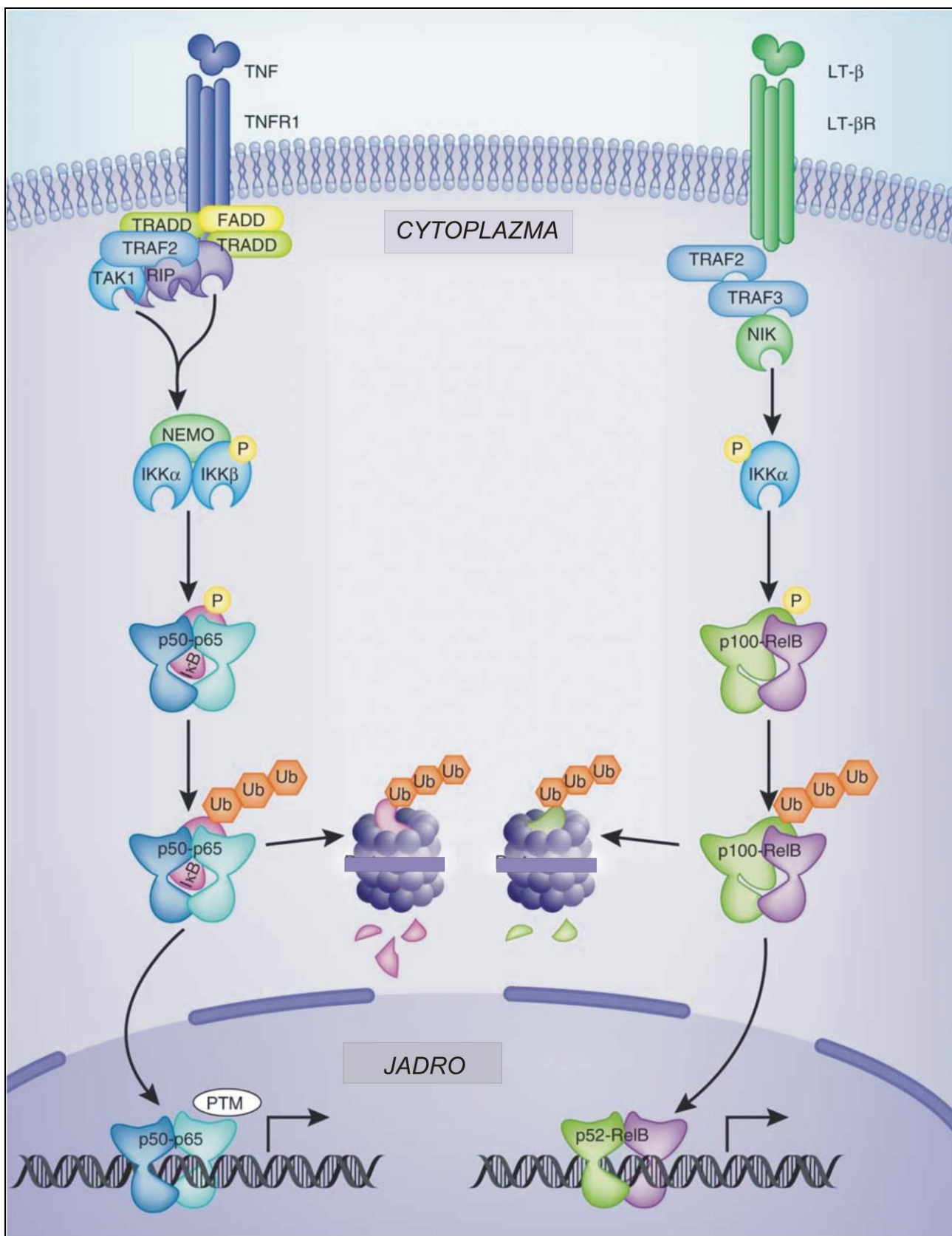
Napriek rozsahu svojich transkripčných aktivít sa do popredia záujmu dostávajú aj proapoptotické nezávislé funkcie p53 [Speidel a kol., 2010]. Aktivácia p53 v nejadrovej oblasti je postačujúca na priamo alebo nepriamo vyvolanú apoptózu indukciou členov Bcl-2 rodiny. Hlavným zdrojom mitochondriálnej translokácie p53 je stresom stabilizovaná cytoplazmatická rezerva tejto bielkoviny. Niektorí autori však oponujú, že nestresová cytoplazma obsahuje zmes nestabilnej polyubiquitinovanej p53, ktorá je hneď predurčená na proteázomovú degradáciu, a funkčnej monoubiquitinovanej p53, ktorá slúži ako zdroj pre translokáciu p53 do mitochondrie (obr. 5). V mitochondrii p53 indukuje oligomerizáciu Bax a Bak. Ďalej fyzicky interaguje s ochrannými proteínmi Bcl-xL a Bcl-2, čím sa správa ako antagonist ich aAP účinku a tiež tvorí komplex s cyklofilínom D, čo vedie k narušeniu mitochondriálnej štruktúry [Wolff a kol., 2008].

Okrem mitochondriálne cieleného pôsobenia bola nedávno objavená alternatívna p53 smrtiaca dráha aktivovaná priamo v cytosóle cez Bax [Chipuk a kol., 2005]. Po stresovom ataku, jadrový p53 indukuje transkripciu Puma, ktorý v zápätí uvoľní p53 z neaktívneho komplexu p53-Bcl-xL prostredníctvom väzby na Bcl-xL. Cytosólový p53 potom indukuje homo-oligomerizáciu Bax, čím sa Bax následne translokuje do mitochondrie (obr. 5). Cytosólový p53 môže ovplyvňovať ďalšie mechanizmy mimo apoptózy, ako je napr. potláčanie autofágie v mitochondriách [Tasdemir a kol., 2008].

3.5.2 NFκB

Nukleárny transkripčný faktor (NFκB) bol objavený v roku 1986 vedcami Senom a Baltimorem [Sen a Baltimore, 1986]. Ľudská NFκB rodina pozostáva z piatich členov: NFκB1 (p105 a p50), NFκB2 (p100 a p52), RelA (p65), RelB a c-Rel. Tieto proteíny majú spoločnú Rel homológnu doménu, ktorá sprostredkováva viazanie na DNA, dimerizáciu a interakciu so špecifickými inhibičnými faktormi, označovanými IκB [Escárcega a kol., 2007]. Nukleárny faktor je aktivovaný rôznymi stimulmi, ku ktorým patria rastové faktory, cytokíny, lymfokíny, radiácia, farmakologické agensy a stres. V neaktívnej forme je NFκB naviazaný v cytoplazme na proteíny IκB rodiny. Spomínané stimuly fosforyláciou a následnou degradáciou IκB (prostredníctvom IκB kináz - IKK) aktivujú NFκB. Výsledkom je samotná translokácia NFκB do jadra bunky, kde sa viaže na regulačné sekvencie rôznych génov a tým aktivuje ich transkripciu [Gilmore, 2006]. NFκB reguluje expresiu viacerých génov spojených s apoptózou, replikáciou vírusov, tumorigenézou, zápalmi a ďalšími autoimunitnými ochoreniami [Pacífico a Leonardi, 2006].

Existujú dve výrazné dráhy aktivácie NFκB. Prvá, označovaná ako klasická (vľavo na obr. 6), je spúšťaná v odpovedi na mikrobiálnu a vírusovú infekciu. Táto klasická dráha môže tiež podstupovať pro-zápalovým cytokínom, ktoré aktivujú tri jednotky IKK komplexu vedúce k fosforylácii a tým indukujú degradáciu IκB. Táto dráha závisí na kinázovej aktivite katalytickej podjednotke IKKβ [Oeckinghaus a kol., 2011]. Ďalšia dráha označovaná ako alternatívna (vpravo na obr. 6), vedie k selektívnej aktivácii p52:RelB dimérov cez indukciu prekursorového proteínu NFκB2/p100. Signálna dráha je spúšťaná špecifickým setom receptorov z rodiny TNF cytokínov: BAFFR – B-bunkový aktivačný faktor; CD40 – lymfotoxínový β-receptor (LTβR); RANK – aktivačný receptor pre nukleárny faktor κB; TNFR2, atď. [Sun, 2011]. Obidve dráhy regulujú ako bunkovú smrť, tak aj prežívanie bunky: - klasická dráha je zodpovedná za inhibíciu programovanej bunkovej smrti za viacerých podmienok; - alternatívna dráha je dôležitá pri prežívaní nezrelých B buniek a vývoji sekundárnych lymfatických orgánov [Luo a kol., 2005].



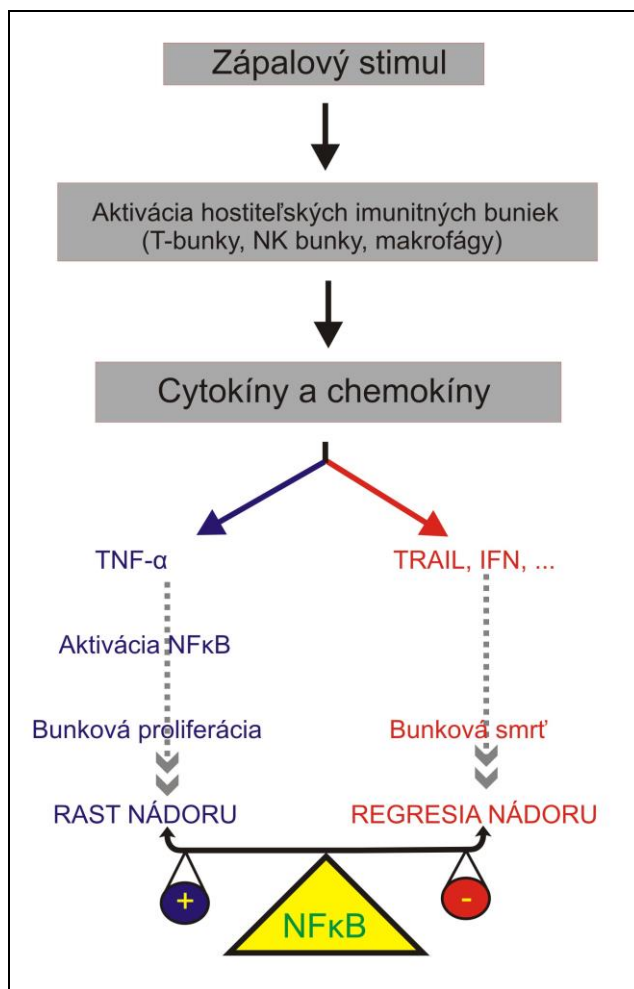
Obrázok 6: **Signálne dráhy NFκB.** Existujú dve signalizačné dráhy pre NFκB. Klasická (vľavo), označovaná tiež za kanonickú, je väčšinou indukovaná fyziologickými podnetmi cez TNFR1 signalizáciu. Stimulácia TNFR1 vedie

k naviazaniu TRADD, ktorý predstavuje platformu pre väzbu FADD a TRAF2. TRAF2 sa spája s RIP1 pre aktiváciu IKK. I κ B α je fosforylovaný IKK β a NEMO-závislým spôsobom, čo má za následok jadrovú translokáciu p65. Transkripčná aktivita jadrového NF κ B je ďalej upravovaná pomocou post-transkripčných modifikácií (PTM). Za kľudových podmienok sú NF κ B diméry viazané na inhibičné proteíny I κ B, ktoré uchovávajú neaktívne komplexy v cytoplazme. Degradácia proteínov I κ B je iniciovaná prostredníctvom I κ B kinázovej fosforylácie, ktorá pozostáva z dvoch katalyticky aktívnych kináz (IKK α a IKK β) a regulačnej podjednotky IKK γ , označovanej tiež NEMO. Fosforylované I κ B proteíny sú tak cieľom pre ubiquitináciu a proteázomovú degradáciu, ktorá tak uvoľňuje viazané NF κ B diméry a tie sa môžu translokovať do jadra. Naopak, alternatívna (nekanonická) dráha je vyvolaná cytokínmi rodiny TNF, ako je CD40L, BAFF a lymfotoxín- β (LT- β). Táto dráha zahŕňa IKK α sprostredkovanú fosforyláciu p100 asociovanú s RelB. Aktivácia IKK α a fosforylácia p100 závisí na NIK proteíne, ktorý podlieha komplexnej regulácii TRAF3, TRAF2 a ďalších ubiquitinovaných ligáz. LT- β R, receptor pre lymfotoxín- β . Prevzaté a upravené z publikácie: Oeckinghaus a kol., 2011.

Nukleárny faktor κ B sa vyznačuje ako antiapoptotickými, tak aj proapoptotickými funkciami. Za fyziologických podmienok aktivácia NF κ B indukuje rezistenciu na apoptotické stimuly aktiváciou viacerých komplexov bielkovín (TNF, IAP, X-IAP a pod.). Avšak pri odozve na hlavné resp. určité stimuly môže aktivácia NF κ B viesť k indukcii apoptózy [Pacífico a Leonardi, 2006; Escárcega a kol., 2007]. Hlavným spúšťačom NF κ B aktivácie je induktor PBS, tumor nekrotizujúci faktor alfa. TNF- α spustí PBS iba vtedy ak je inhibovaná syntéza nových proteínov alebo RNA, resp. je bunka v NF κ B deficite [Luo a kol., 2005]. Mechanizmy NF κ B sprostredkovanej apoptózy sú v podstate založené na jeho schopnosti aktivovať transkripciu množstva génov umožňujúcich potlačenie bunkovej smrti [Kucharczak a kol., 2003]. Patria medzi nich:

- i. členovia Bcl-2 rodiny, Bcl-xL a Bfl-1/A1, ktoré potláčajú uvoľnenie pAP cytochrómu-c a Smac/Diablo z mitochondrie a tým blokujú PBS v odpovedi na TNF α a chemoterapeutiká;
- ii. bunkové inhibítory apoptózy c-IAP1, c-IAP2, TRAF1 a TRAF2, „zinc-finger“ proteín A20, c-FLIP. Všetky z nich sú schopné potlačiť bunkovú smrť cez TNF α alebo bunkový receptor;
- iii. aAP gény X-IAP, ktoré inhibujú procesovanie prokaspázy-9 a aktivujú kaspázu-7, -3 a GADD45 β , ktorý patrí do rodiny GADD45, t.j. faktorov zapletených v kontrole bunkového cyklu a DNA opravy.

Je známe, že inhibícia NF κ B v nádorových bunkách konvertuje zápalom indukovaný rast na regresiu nádoru. Aktivácia vrodeneho a získaného imunitného systému, môže mať hlboký účinok na rast a vývoj nádoru. V malígnej bunke je práve NF κ B hlavný modulátor nádorovej odpovedi na zápal (obr. 7). Aktivácia NF κ B podporuje rezistenciu buniek na cytokín TRAIL, čo vedie k rastu nádoru. Naopak, inhibíciou NF κ B sa zabráni zápalom-stimulovanému rastu nádoru a prostredníctvom TRAIL (obr. 7) nastúpi cesta regresie nádoru [Luo a kol., 2005].



Obrázok 7: Úloha NFκB pri zápalom riadenej progresii nádoru.

Nukleárny faktor κB ďalej reguluje aktivitu a expresiu Cyklínu D1 [Guttridge a kol., 1999], CDK2 kinázy [Perkins a kol., 1997] a c-Myc, ktoré kontrolujú bunkový cyklus a sú zmenené v niektorých solidných tumoroch, ako napríklad karcinómy prsníka, prostaty a ovarií. Na NFκB je závislá aj expresia a funkcia viacerých cytokínov, ktoré sú rastovými faktormi pre nádorové bunky. Patria sem : IL-1beta – rastový faktor pre akútnu myeloidnú leukémiu (AML), TNF – rastový faktor pre Hodgkinov lymfóm, rastový faktor pre T-bunkový lymfóm a glióm, IL-6 – rastový faktor pre mnohopočetný myelóm [Pahl, 1999]. Niektoré rastové faktory, ako epidermálny rastový faktor (EGF), alebo receptory pre rastové faktory, ako HER2, sú schopné podporovať rast solídnych tumorov aktivovaním NFκB [Biswas a kol., 2000]. Aktivita NFκB je tiež spojená s reguláciou angiogenézy, ktorá je základom pre rast a invazivitu nádorov [Kiriakidis a kol., 2003]. Zmena expresie génov zapojených do regulácie apoptózy je často spôsobená práve poruchou regulácie aktivity NFκB [Pacífico a Leonardi, 2006].

3.5.3 AKT kináza

Kináza AKT je serín/treonín-proteínová kináza (tiež označovaná ako proteín kináza B), ktorá všeobecne sprostredkováva signály potencujúce prežitie buniek. U cicavcov boli doteraz identifikované 3 izoformy: AKT1, AKT2 a AKT3 [Crowell a kol., 2007]. Kináza je aktivovaná fosfatidylinozitol-3-fosfokinázou (PI3K), ktorá prenáša signál z cytokínov, rastových faktorov a onkoproteínov na viaceré cieľové proteíny, vrátane AKT. Táto aktivácia umožní lokalizovať AKT na plazmatickej membráne, kde je fosforylovaný treonín³⁰⁸ a serín⁴⁷³. Najdôležitejším negatívnym regulátorom signalizačnej dráhy PI3K/AKT je tumorový supresor PTEN [Planchon a kol., 2006].

Samotná AKT oslabuje prenos signálov a aktiváciu v rámci vnútornej signálnej dráhy apoptózy, a to fosforyláciou proteínu Bad alebo inaktiváciou transkripčných faktorov vedúcich k produkcii proapoptotických faktorov, ako sú Fas ligand či Bid [Lauber a kol., 2004]. AKT kináza tiež aktivuje IKK kinázu, ktorá je pozitívny regulátor NFκB faktora a zúčastňuje sa na zoslabovaní apoptotických dejov navodených depléciou extracelulárnych signálnych faktorov, oxidatívnym a osmotickým stresom, iradiáciou, ischemickým šokom či chemoterapeutikami [Wang a kol., 2002].

3.5.4 Fosfatidylinozitol-3-fosfokináza

Fosfatidylinozitol-3-fosfokináza (PI3K) je kináza, ktorá zohráva centrálnu úlohu pri signálnych dráhach bunky, ktoré zodpovedajú za prežívanie, proliferáciu, motilitu a tkanivovú neovaskularizáciu. Reprezentuje rodinu lipidových kináz, ktoré fosforylujú 3'-OH skupinu inozitolového kruhu fosfatidylinozitolu. Samotný fosfatidylinozitol je súčasťou eukaryotických membrán bunky. Inozitolová časť fosfolipidov, môže byť fosforylovaná na viacerých miestach pomocou kináz, ktoré pôsobia ako signálne spínače [Fruman a kol., 1998]. Na základe štruktúry, funkcie a substrátovej selektivity sú PI3 kinázy klasifikované do troch tried, označenými ako I, II a III. Každá trieda obsahuje rozdielne izoformy, pričom najviac spájaná s nádormi je trieda IA (PIK3Cα, PI3KCβ a PI3KCδ). Tieto kinázy sú heterodimérne proteíny s regulačnou (p85) a katalytickou podjednotkou (p110), ktorá fosforyluje fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát (4,5-PIP₂) a generuje sekundárneho posla fosfatidylinozitol-3,4,5-trifosfát (PIP₃) [Guibert a kol., 2008]. Podjednotka p110, kódovaná *PI3KCA* génom, je spätne regulovaná väzbou rastového faktora na tyrozín kinázový receptor a receptor G proteínu. Aktivovanie mutácií na géne *PI3KCA* a regulátore p85 boli identifikované u rakoviny prsníka [Luo a Cantley, 2005].

Produkcia sekundárnych poslov (transportujúce signály do cytoplazmy bunky), triedou kináz IA, zohráva kľúčovú úlohu v signalizácii niekoľkých efektorových proteínov obsahujúcich serín-treonínovú kinázu AKT a PDK1 (fosfoinozitol-závislú kinázu 1). Ich membránová kolokalizácia vedie k fosforylácií na mieste Thr³⁰⁸ a čiastočnej aktivácii AKT kinázy. Ďalšia fosforylácia pomocou PDK2 v

oblasti Ser⁴⁷³ vedie ku kompletnej aktivácii AKT [Wang a kol., 2005]. Prvý zo spomínaných poslov (4,5-PIP₂) aktivuje kinázu, ktorá následne fosforyluje určité proteíny (IκB, NFκB, Bad, kaspáza-9 a pod.) zodpovedné za prežívanie bunky [Cantley, 2002]. Niektoré proteíny, ktoré sú spojené so vznikom nádorových chorôb, môžu spôsobovať poruchu práve v regulácii PI3K dráhy [Ghobrial a kol., 2005].

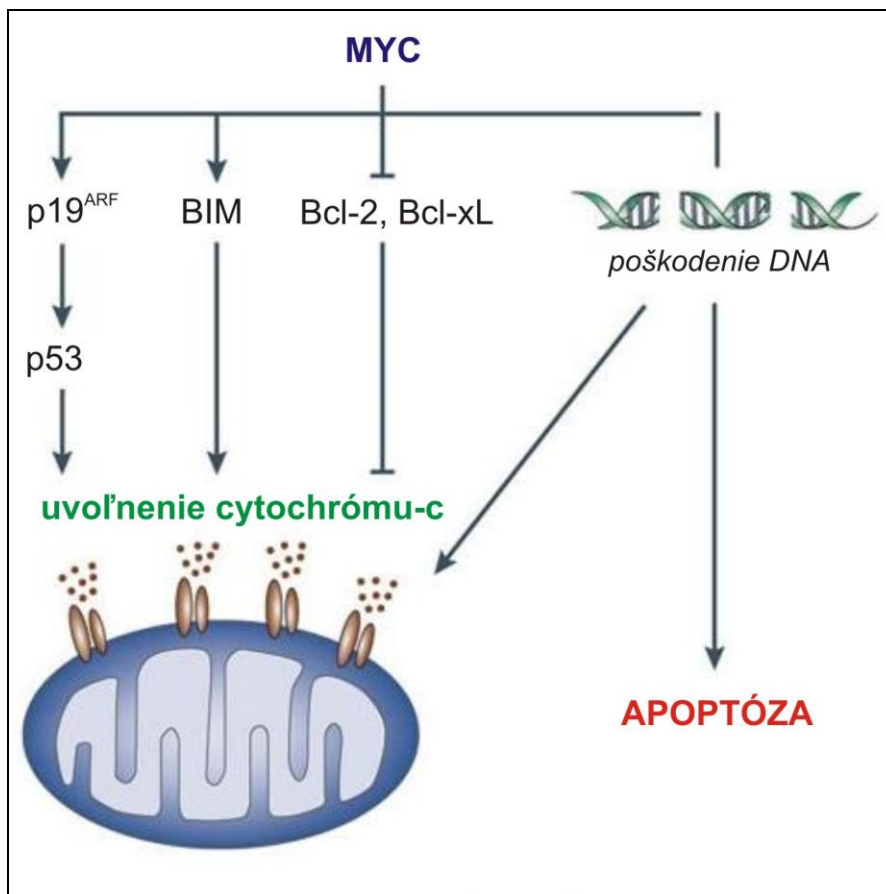
PI3K-Akt dráha je dráha, ktorá výrazne podporuje prežívanie bunky. V mnohých nádoroch je táto dráha aktivovaná stratou funkcie mutáciou *PTEN* supresorového génu [Zhang a Yu, 2010] alebo získaním funkcie mutáciou onkogénov ako *Ras*, *BCR-ABL* [Nagle a kol., 2004] alebo receptorov rastového faktora ako EGFR [Chen a kol., 2001].

3.5.5 Myc

U cicavcov boli doposiaľ popísané tri Myc proteíny (c-Myc, N-Myc a L-Myc) s podobnou štruktúrou, ale s významnými rozdielmi v účinnosti a úrovni expresie [Nesbit a kol., 1998]. Všeobecná stavba Myc je podobná ako u väčšiny DNA-viažúcich transkripčných regulátorov. Na amino konci leží transkripčná aktivačná doména (TAD), oblasť potrebná pri fúzii s DNA viažúcou doménou (DBD) [Kato a kol., 1990].

Členovia Myc rodiny hrajú dôležitú úlohu v bunkovej proliferácii ako aj v bunkovej smrti [Tansey, 2014]. Myc proteíny regulujú rýchlosť bunkového rastu a prechod medzi G1 a S fázou bunkového cyklu [Pelengaris a kol., 2002]. Ich aktivácia môže viesť k bunkovej strate prostredníctvom apoptózy. Jednoducho povedané, nadmerná expresia Myc indukuje bunkovú proliferáciu a kompenzuje apoptózu [Bouchard a kol., 2004].

Deregulácia expresie *c-Myc* je ústredným faktorom transformačnej aktivity malígnych buniek. *c-Myc* sa viaže na DNA a v komplexe s proteínom Max indukuje transkripciu špecifických génov. Nesprávne načasované a nekontrolované zvýšenie syntézy *c-Myc* umožňujú predovšetkým dva mechanizmy, a to génová amplifikácia a chromozomálna translokácia génu *c-Myc*. Chromozomálne translokácie v súvislosti s aktiváciou onkogénu *c-Myc* sa najčastejšie vyskytujú pri B-bunkových leukémiách. U agresívnych typov sa navyše vyskytuje spolu s Bcl-2 translokáciou [Pedersen a kol., 2012].



Obrázok 8: **Dráhy, ktoré ovplyvňuje Myc proteín.** Cestou nepriamej indukcie reguluje expresiu p19ARF, ktorý stabilizuje proteín p53. Ďalej indukuje pAP proteín BIM a blokuje aAP proteíny Bcl-2 a Bcl-xL, čo nakoniec vedie k uvoľneniu cytochrómu-c, cestou p53 nezávislým spôsobom. Ďalším potenciálnym mechanizmom Myc-sprostredkovanej apoptózy je schopnosť zapríčinenia DNA poškodenia a tým zablokovania jej množenia. Upravené podľa Adhikary a Eilers, 2005.

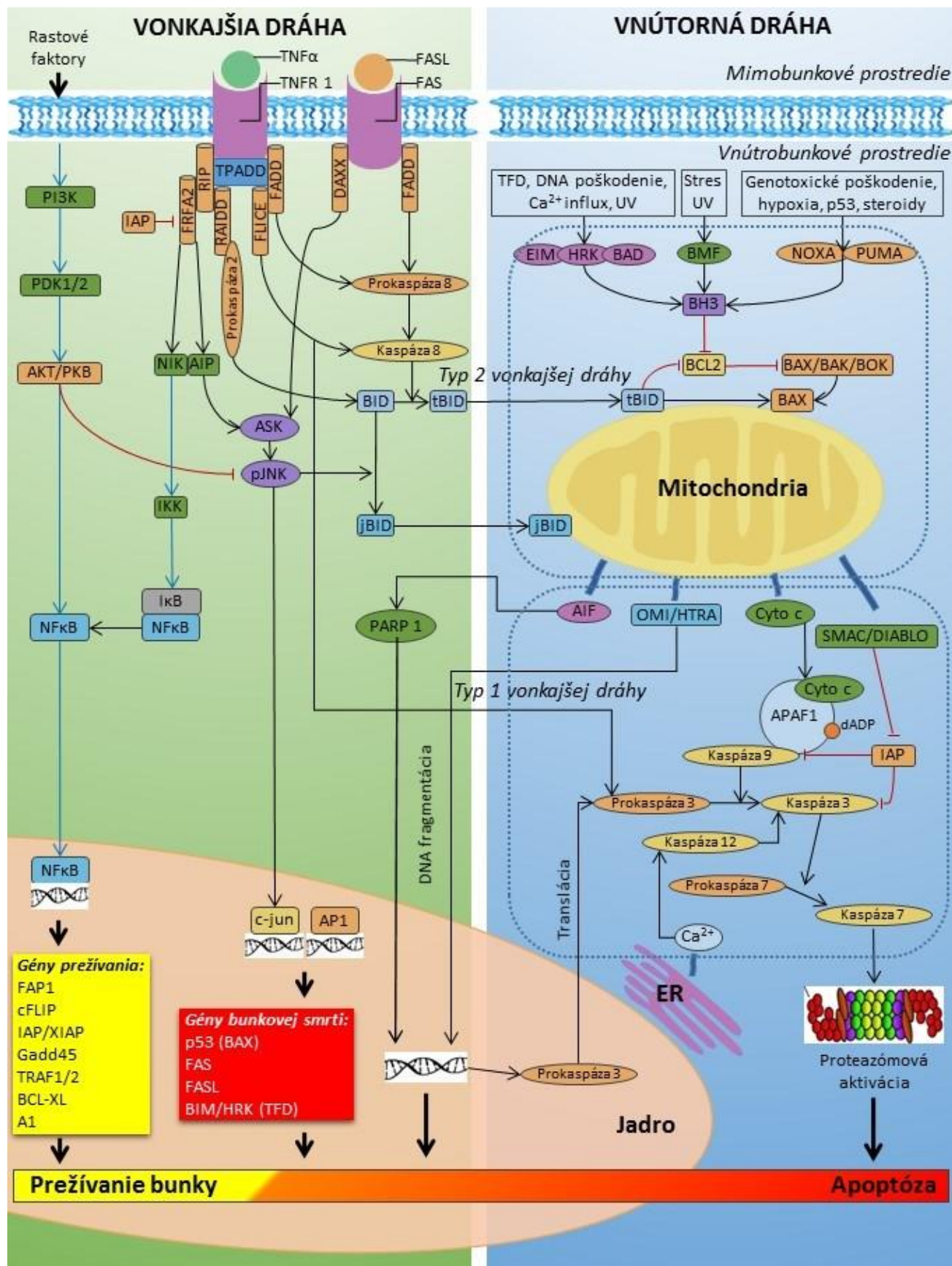
Samotná onkogénna aktivácia *c-Myc* má za následok nielen bunkovú proliferáciu, ale tiež zvýšenie citlivosti týchto buniek k apoptóze [Nieminen a kol., 2007]. Zvýšená aktivita *c-Myc* senzibilizuje bunky voči proapoptotickým faktorom a vedie hlavne k aktivácii vnútornej mitochondriálnej signálnej dráhy a uvoľneniu cytochrómu-c do cytoplazmy, obrázok č.8. Myc proteín môže navyše navodzovať poškodenie DNA, pretože aktivuje enzýmy produkujúce kyslíkové radikály [Adhikary a Eilers, 2005].

4 SIGNÁLNE DRÁHY APOPTÓZY

Molekulárne mechanizmy apoptózy, najmä na úrovni aktivácie, sú rôznorodé. Aj keď znalosť detailných signálnych dráh, ktoré spúšťajú apoptózu nie je kompletne známa, tento proces je kontrolovaný veľkým počtom komplexov proteínov. Dané komplexy sú aktivované rôznymi spúšťačmi, zoradenými v sekvenčných moduloch [Ghobrial a kol., 2005]. Podľa súčasných poznatkov je apoptóza aktivovaná dvomi hlavnými dráhami: **vonkajšou** (receptorová) a **vnútornou** (mitochondriálna).

Vonkajšia dráha, niekedy tiež označovaná ako receptorová alebo cytoplazmatická je spúšťaná cez Fas smrtiaci receptor, ktorý patrí do rodiny receptorov tumor nekrotizujúceho faktora (TNF) [Zapata a kol., 2001]. Vnútorná alebo mitochondriálna dráha, ktorá po stimulácii vedie k uvoľneniu cytochrómu-c z mitochondrií a tým aktivuje smrtiace signály [Caroppi a kol., 2009], je označovaná za druhú. Obidve dráhy konvergujú do spoločnej koncovej dráhy proteáz (obr. 9). Aktivácia kaskády proteáz, nazývaných kaspázy, vedie k proteolytickej degradácii regulačných a štrukturálnych proteínov a nakoniec vyústi do bunkovej smrti [Ghobrial a kol., 2005].

Obrázok 9 (str. 44): **Schématické znázornenie vnútornej a vonkajšej apoptotickej dráhy.** Čierne šípky predstavujú dráhy vedúce k apoptóze a modré reprezentujú signály prežívania. **Vonkajšia dráha** je iniciovaná väzbou extracelulárnych ligandov na receptory smrti. Aktivácia TNFR1 vedie k tvorbe TRADD–RIP–TRAF2 komplexu, ktorý signalizuje cez NFκB prežívanie alebo cez JNK smrť bunky. RIP aktivuje prokaspázu-2 a uvoľňuje BID. Komplex TRADD–FADD–FLICE aktivuje prokaspázu-8, a tá následne spúšťa AP cez kaspázu-3 alebo formovaním kratšej formy BID (tBID). Dráha spúšťaná cez FAS receptor stimuluje FADD a DAXX proteíny a tým sa aktivuje vonkajšia dráha 1. typu. **Vnútorná dráha** je iniciovaná v mitochondriách na základe rozmanitých stimulov. Hlavnými črtami sú membránová permeabilizácia, uvoľnenie cyt-c, aktivácia kaspázovej kaskády a následné formovanie apoptozómu. **Význam skratiek:** AIP1, ASK1-interagujúci proteín 1; AKT/PKB, proteín kináza B; AP1, aktivátor proteínu-1; ASK1, apoptózu signalizujúca kináza-1; BAD, BCL2-asociovaný proteín; BAK, BCL2-agonistický zabiják 1; BIM, BCL2-interaktívny mediátor bunkovej smrti; BMF, BCL2-modifikujúci faktor; BOK, BCL2-ovariálny smrtiaci proteín; HRK, 5/harakiri; IκB, inhibičná podjednotka NF-κB; IKK, IκB kináza; NIK, NF-κB-indukujúca kináza; NOXA, Forbol-12-myristát-13-acetát-indukujúci proteín (PMAIP1); PDK1/2, 3-fosfo-inozid závislá kináza 1/2; PI3K, fosfatidyl-inozitol-3-kináza; pJNK, c-Jun amino (N) terminálna kináza; PUMA, p53-nadregulovaný modulátor apoptózy; RAIDD, RIP-asociovaný ICH-1 homológny proteín so smrtiacou doménou; XIAP, X-chromozómový inhibítor apoptózy. (Upravené podľa publikácie: Benn a Woolf, 2005)



4.1 Vonkajšia dráha

Vonkajšia apoptotická dráha zahŕňa niekoľko proteínových skupín, akými sú receptory smrti, na membránu viazané Fas ligandy, komplexy Fas, Fas-asociovaná smrtiaca doména i efektorové kaspázy-8 a -10, ktoré aktivujú výkonné kaspázy [Ghobrial a kol., 2005]. Vonkajšia dráha apoptózy je iniciovaná rôznymi typmi signálov, ktoré môžeme rozdeliť do troch skupín (Ghatage a kol., 2014):

- i. indukcia prostredníctvom TNF receptora;
- ii. signalizácia cez Fas receptor;
- iii. indukcia formou ligandu TRAIL.

V prvom type sa väzbou ligandu TNF na receptor spúšťa väzba cytoplazmatického proteínu na cytoplazmatickú časť receptora. Aktivácia receptora TNFR1 vedie k formovaniu komplexu TRADD-RIP-TRAF2, ktorý signalizuje prostredníctvom NF- κ B dráhu prežívania alebo cez JNK (c-Jun-N-terminálnu kinázu) dráhu k navodeniu smrti (obr. 9). Práve receptor interagujúci proteín (RIP) spúšťa do činnosti prokaspázu-2 a tým sa rozštiepi proteín Bid na skrátenú formu tBid. Bid je tiež modifikovaný aj cez molekulu JNK (aktivovaná DAXX proteínom), ktorá umožní jeho translokáciu do mitochondrie vo forme jBid, čím sa uvoľní druhý mitochondriálny aktivátor kaspáz SMAC/DIABLO. Komplex formovaný adaptorovým proteínom FADD (TRADD-FADD-FLICE), prostredníctvom interakcie DD domén, aktivuje prokaspázu-8, ktorá sa autokatalyticky aktivuje za vzniku aktívnej kaspázy-8. Tá následne spúšťa aktiváciu kaspázovej kaskády cez kaspázu-3. Kaspázová kaskáda je uvedená v ďalšej kapitole, ako koncová dráha apoptózy.

Môžeme povedať, že aktiváciu vonkajšej dráhy reguluje niekoľko ďalších dráh a proteínových molekúl. Dysregulácia týchto modulátorov vonkajšej dráhy predpokladá vznik malígnych transformácií, akými sú mutácie alebo delécie *Fas* génu, resp. celej receptorovej dráhy. [Landowski a kol., 2001; Tognon a kol., 2011]. Medzi regulátory spomínanej dráhy patria transkripčný faktor NF κ B a aktivačný proteín 1 (AP1), ktoré pôsobia priamo na *FasL* gén – transkripčne inaktívovaný gén [Wajant, 2002].

4.2 Vnútoraná dráha

Pri vnútornej, alebo tiež označovanej mitochondriálnej dráhe môžeme hovoriť, že je aktivovaná dvomi spôsobmi. Permeabilizáciou vonkajšej mitochondriálnej membrány, ktorá môže byť navodené rôznymi udalosťami alebo priamym poškodením jadrovej DNA vplyvom metabolitov, toxínov, voľnými radikálmi a ich derivátmi. V prípade poškodenia DNA zohráva dôležitú úlohu gén *p53* a ním kódovaný rovnomený proteín. Dominantou pri mitochondriálnej vnútornej signálnej dráhe je cytochróm-c, ktorý sa uvoľní do cytoplazmy, kde spúšťa radu následných krokov [Jin a El-Deiry, 2005].

Dráha je regulovaná relatívnou koncentráciou Bcl-2 podobných proteínov vo vnútornej mitochondriálnej membráne. Tie kontrolujú translokáciu určitých proteínov z mitochondriálneho matrix (endonukleáza G) a medzimembránového priestoru (cytochrómu-c) do cytoplazmy. U ľudí existuje okolo 24 rôznych Bcl-2 podobných proteínov (tab. 4), ktoré možno rozdeliť do nasledujúcich skupín:

- i. antiapoptotické proteíny ako Bcl-2 a Bcl-xL;
- ii. proapoptotické proteíny ako Bax a Bak, ktoré sú nevyhnutné pri formovaní pórov;
- iii. proapoptotické proteíny ako Bid, Bad, PUMA a Noxa, ktoré podporujú vznik pórov.

Vnútoraná dráha začína v mitochondriách na základe rôznych podnetov. Membránová permeabilizácia je sprostredkovaná výlučne BH3 proteínmi, ktoré udržiavajú a inhibujú mitochondriálnu translokáciu Bax a následne uvoľnenie cyt-c, SMAC/DIABLO, AIF a HTRA2/OMI. Antiapoptotické proteíny Bcl-2 a Bcl-xL zabraňujú úniku cyt-c a tým bunkovej smrti kompetitívnou väzbou na Bak a Bax, čím znemožňujú vytváranie pórov v mitochondriálnej membráne ich vzájomnou oligomerizáciou. Vylúčením cyt-c cez póry vytvárané vo vonkajšej mitochondriálnej membráne Bcl-2 podobnými proapoptotickými proteínmi (Bax a Bad) je apoptóza aktivovaná (obr. 9). To znamená, že Bax/Bak vonkajšiu membránu permeabilizujú, čo vedie k „vylatiu“ ďalších apoptogénnych proteínov a otvoreniu veľkých iónových kanálov vo vnútornej i vonkajšej mitochondriálnej membráne. Následne dochádza k prúdeniu molekúl vody so spojením straty iónovej nerovnováhy na membráne. Mitochondria tak „bobdnú“, stráca svoj potenciál, vnútoraná membrána praská a dochádza k uvoľneniu matrix do cytoplazmy bunky. Celý tento proces vedie k smrti bunky vďaka uvoľneniu mitochondriálnych proteínov do cytoplazmy, čo spúšťa kaskádu ďalších dejov a taktiež strátu základnej úlohy mitochondrie, teda produkcie ATP v dýchacom reťazci [Jin a El-Deiry, 2005].

Cytochróm-c sa v cytoplazme naviaže na APAF1, čím sa vytvorí apoptozóm, ktorý konvertuje prokaspázu-9 na kaspázu-9 a tá následne aktivujú kaspázy -3 a -7. Kaspáza-3 štiepi svoje substráty, pričom dochádza k deštrukcii cytoskeletu a aktivácii rôznych enzýmov. Typickým príkladom je indukcia kaspázou aktivovanej DNázy (CAD – caspase-activated DNase), ktorá je zodpovedná za štiepenie genómovej DNA, prostredníctvom proteolytickej degradácie inhibítora kaspázou aktivovanej

DNázy (ICAD) [Hotchkiss a kol., 2009]. Ďalej, SMAC/DIABLO cez IAP (antiAP proteíny zastavujúce apoptózu inhibíciou aktivovaných kaspáz) potláča spustenie kaspázovej kaskády. Uvoľnenie AIF z mitochondrie spôsobuje degradáciu DNA prostredníctvom PARP1 (poly ADP-ribóza polymeráza-1). AIF má teda nepriamu úlohu pri chromozómovej degradácii.

Môžeme povedať, že jednými z najdôležitejších regulátorov vnútornej dráhy sú proteíny Bcl-2 rodiny. Zvýšená expresia Bcl-2 zapríčiňuje rezistenciu na chemoterapeutiká a radiačnú liečbu, zatiaľ čo znížené hladiny Bcl-2 môžu podporovať apoptotické odpovede na chemoterapeutickú liečbu. Zvýšená expresia Bcl-2 sa navyše môže akumulovať v bunkách počas G0 fázy úseku bunkového cyklu a tým prispievať ku chemorezistencii [Konopleva a kol., 2002].

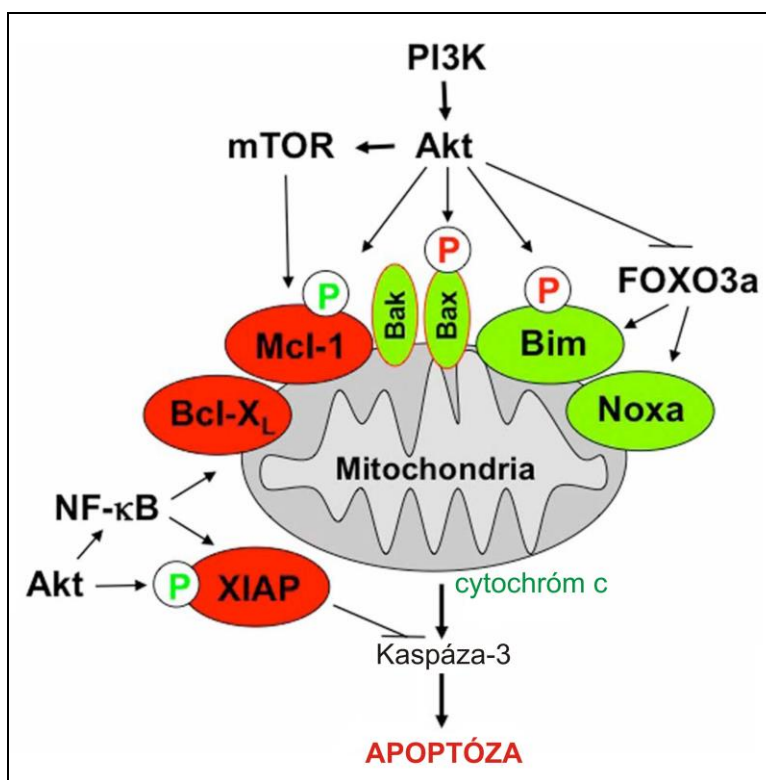
4.3 Kaspázová koncová dráha

Kaspázy, ako je vyššie uvedené, sú proteíny s proteolytickou aktivitou, ktoré vykazujú pomerne širokú substrátovú špecificitu a štiepia viaceré cytoplazmatických proteíny. Kaspázová kaskáda zahŕňa efektorové kaspázy (kaspáza-8, kaspáza-9, kaspáza-10), ktoré proteolyticky aktivujú výkonné kaspázy (kaspáza-3, kaspáza-6, kaspáza-7). Výkonné kaspázy štiepia svoje cytoplazmatické substráty, čo vedie k rozvinutiu apoptózy. Medzi ich substráty patria najmä štrukturálne proteíny (napr. fodrin, G-aktín), proteíny zúčastňujúce sa prenosu bunkových signálov (napr. proteín kináza C) a proteíny bunkového cyklu a opráv DNA (napr. Mdm-2). Kaspáza-8 okrem aktivácie výkonných kaspáz proteolyticky aktivuje aj Bid, ktorý podporuje vznik pórov v mitochondriálnej membráne, a tým napomáha iniciácii mitochondriálnej dráhy apoptózy [Hotchkiss a kol., 2009].

Vonkajšia a vnútorná dráha konvergujú až pri kaspáze-3, ktorá štiepi inhibítor kaspázou aktivovanej DNázy (ICAD), čím sa stáva CAD aktívna a spúšťa jadrovú apoptózu. Obidve signálne dráhy sú prepojené aj cez kaspázu-8, ktorá je síce dominantná kaspáza vonkajšej dráhy, ale môže byť regulovaná i vlastným „výkonným“ enzýmom apoptózy, kaspázou-6. Podľa *in vivo* štúdie môže byť kaspáza-6 hlavným aktivátorom kaspázy-8, keďže jej inhibícia výrazne znížila aktivitu kaspázy-8 a ovplyvnila celkové naštartovanie apoptózy [Cowling a Downward, 2002]. Iniciácia kaspáz spôsobí degradáciu proteínkináz, cytoskeletálnych proteínov a proteínov zodpovedných za opravu DNA. Ďalej spúšťa podjednotky endonukleáz a nakoniec zničí „housekeeping“ bunkové funkcie. Kaspázy majú taktiež vplyv na cytoskeletálnu štruktúru, reguláciu bunkového cyklu, signálne dráhy, čo sa v konečnom dôsledku prejavuje morfológickými zmenami, akými je kondenzácia a fragmentácia DNA, resp. napučiavanie membrány [Grütter a kol., 2000].

4.4 Dráha PI3K/AKT/mTOR

Dráha PI3K/AKT/MTOR reprezentuje kľúčovú transdukčnú dráhu pre bunkový rast a blokáciu bunkovej smrti. Abnormálne vysoká aktivácia PI3K/AKT/mTOR kaskády je charakteristickým znakom veľkej variácie pri ľudských malignanciách a je spájaná s karcinogénou, nádorovou progresiou, rezistenciou na liečbu a taktiež zlou prognózou [Engelman, 2009]. Vázba ligandov rastových faktorov na ich receptory je výsledkom angažovania kaskády prežívania a proliferácie vo vnútrobunkovom priestore. Spúšťačiaci mechanizmus je odpoveďou na fosforyláciu receptorovej tyrozín kinázy, nachádzajúcej sa vo vnútri plazmatickej membrány. Pozitívnym regulátorom tejto signálnej dráhy je tumor supresorový gén *PTEN*, ktorý má charakter lipidovej a zároveň aj proteínovej fosfatázy [Yin a Shen, 2008]. Tumor supresorový gén *PTEN* môže defosforylovať PIP3, čím zablokuje transdukčný signál PI3/Akt.



Obrázok 10: **Schéma signálnej PI3K/AKT/mTOR dráhy.** Kľúčovú signalizáciu zohráva AKT, svojim priamym aj nepriamym pôsobením na apoptotické proteíny. Upravené podľa: Fulda, 2012.

Pri tejto dráhe má kľúčovú úlohu proteín AKT, ktorý má charakter antiapoptotického faktora priamo alebo nepriamo antagonizujúceho bunkovú smrť [Shaw a Cantley, 2006]. Priamo bol AKT spájaný s fosforyláciou kľúčových apoptózu regulujúcich proteínov (obr. 10), čoho výsledkom je posun rovnováhy medzi pro- a anti- apoptotickými proteínmi vedúcej k inhibícii bunkovej smrti [Fulda, 2012]. S touto rovnováhou bolo poukázané na multidoménný proteín Bax, ktorý je fosforylovaný Akt-

závislým spôsobom na serínovom zvyšku v pozícii 184 [Gardai a kol., 2004]. Okrem tejto konformačnej zmeny Bax blokuje AKT aj aktivitu proteínu Bim. Zatiaľ čo fosforylácia proapoptotických proteínov Bax a Bim zmierňuje ich potenciál. Naopak, AKT-sprostredkovaná fosforylácia niektorých aAP faktorov (XIAP a Mcl-1) znižuje ich antiapoptotické vlastnosti znížením ich proteínovej stability. Výsledkom tejto degradácie cez proteázomovú mašinériu je redukcia proteínovej expresie. Za nepriame pôsobenie Akt na bunkovú smrť je považovaná cesta fosforylácie transkripčných faktorov. Tento mechanizmus platí pri faktore NF κ B a cAMP element-viažúcom proteíne (CREB) ako aj faktoroch, ktoré sa označujú FOXO („Forkhead box“ trieda O). AKT fosforylačná stimulácia môže na jednej strane podporovať expresiu antiAP proteínov, kým na druhej strane redukuje hladiny proapoptotických proteínov [Fulda, 2012].

Signálna dráha PI3K/AKT/mTOR reprezentuje regulačný mechanizmus na kontrolu aktivity pro- a antiapoptotických proteínov rodiny Bcl-2, preto objavenie malých molekulových inhibítorov tejto kaskády môžu otvoriť nové perspektívy pri modelovaní mitochondriálnej dráhy apoptózy.

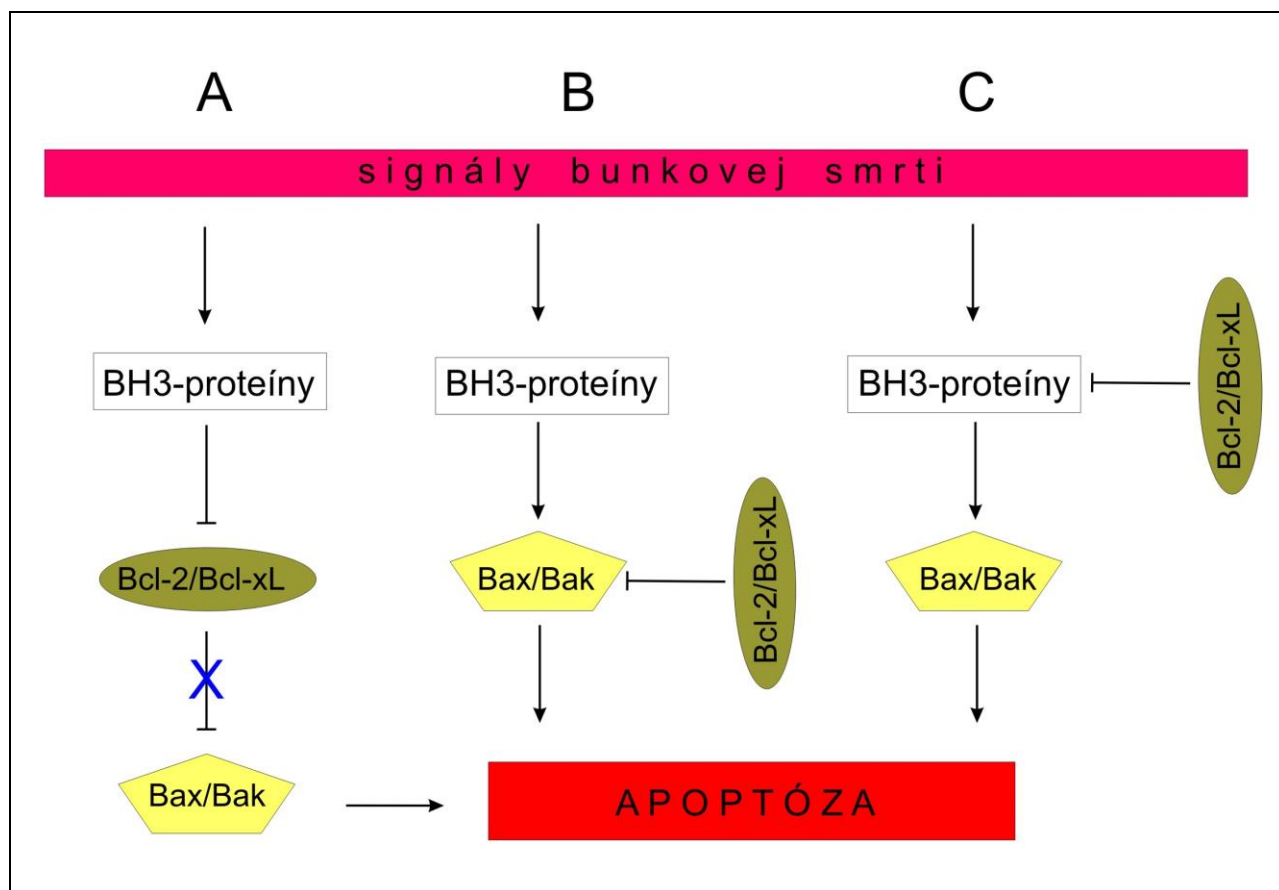
5 REGULÁCIA APOPTÓZY A JEJ ÚLOHA PRI NÁDOROCH

Problémy s reguláciou apoptózy sú prítomné vo veľkom počte ochorení. Nádorové postihnutia sú často charakterizované poruchou apoptózy. Pre nádorové bunky je typické veľké množstvo mutácií, ktoré umožňujú ignoráciu regulačných signálov pre rast a proliferáciu zdravej bunky. Za normálnych okolností poškodené bunky podliehajú apoptóze, ale v prípade mutácií v nádorových bunkách sa môže stať, že tieto bunky nepodstúpia apoptózu. V takýchto stavoch bunková proliferácia nie je kontrolovaná, v dôsledku čoho môže byť daná porucha progresom k formovaniu nádorov. Vo väčšine prípadov je tieto nádory obtiažne vyliečiť pomocou protinádorových liečiv, keďže mutácie v apoptotickej dráhe spôsobia produkciu buniek, ktoré sú rezistentné na tento typ ataku. Preto pochopenie regulácie apoptózy v nádorových bunkách je v súčasnosti významným zameraním pri určovaní cielenej terapie [Hotchkiss a kol., 2009].

Apoptotická kaskáda je veľmi prísne regulovaná. V jej priebehu existujú body, v ktorých sa môžu uplatniť rôzne kontrolné mechanizmy: aktivácia či inaktivácia enzýmov, alebo tiež mieru aktivácie rôznych pro- a anti- apoptotických proteínov. Obidve hlavné dráhy apoptózy sú regulované spoločnými proteínmi, medzi ktoré vo väčšej miere patria: p53, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, NFκB, Myc, AKT a PI3K. Práve vzájomný pomer hladín pro- a antiapoptotických zložiek tak predurčuje definitívny osud bunky. Presný mechanizmus, ako spomínané proteíny regulujú apoptózu nie je známy, existujú však tri modelové situácie, ktoré sú v tejto súvislosti najčastejšie definované (obr. 11):

- i. V prvom modeli sú Bax a Bak udržiavané v neaktívnej formácii cez priamu interakciu s jedným alebo dvomi rozdielnymi aAP Bcl-2 proteínmi. V odpovedi na apoptotický stimul sa BH3-výhradné proteíny viažu a neutralizujú aAP proteíny, výsledkom čoho je uvoľnenie Bax a Bak. Zvýšená expresia Bcl-2 a Bcl-xL predstavuje zablokovanie Bax translokácie a aktivácie [Finucane a kol., 1999]. Úloha proteínu Bak je demonštrovaná pri odlúčení Bcl-xL a Mcl-1 v mitochondriách za normálnych podmienok [Willis a kol., 2005]. Navyše BH3 proteíny zohrávajú centrálnu úlohu pri špecifických väzbách na antiapoptotických členov Bcl-2 rodiny. Napríklad, Bad interaguje s Bcl-2 a Bcl-xL, ale nie s Mcl-1 na ktorý sa viaže Noxa, ktorý však nie je špecifický pre väzbu s Bcl-2 a Bcl-xL [Chen a kol., 2005]. Tieto prepojenia indikujú, že na spustenie smrteľného stimulu sa musí aktivovať viac než len jeden proteín s BH3 doménou. Willis a kolektív dokázali, že uvoľnenie Bak z Bcl-xL a Mcl-1 vyžaduje zvýšenú expresiu oboch proteínov Bad a Noxa. Pri samostatnej aktivácii Bad resp. Noxa proteínu tento efekt nebol pozorovaný. Naopak nadexpresia proteínu Puma, ktorý má vysokú afinitu na väčšinu aAP proteínov, je dostatočná na indukciu Bak sprostredkovanej apoptózy [Willis a kol., 2005].

- ii. Druhou alternatívou pri BH3 proteínoch je ich priamy účinok na Bax a Bak. Zaznamenaná bola priama interakcia tBid a Bim s Bax. Fluorescenčné značenie Bax a tBid nepoukázalo na ich vzájomnú kolakiláziu počas apoptózy. Bax sa nachádza v klastroch na mitochondriách[Nechushtan a kol., 2001].
- iii. Tretím modelom je návrh, že aAP Bcl-2 členovia izolujú BH3 proteíny formou zabránenia aktivácie pAP proteínov Bax a Bak.



Obrázok 11: **Modely regulácie hlavnej apoptotickej dráhy.** Upravené podľa publikácie: Gustafsson a Gottlieb, 2007.

Je zrejmé, že tieto modely ukazujú, že Bcl-2 proteíny sú pravdepodobne regulované niekoľkými mechanizmami, ktoré sa môžu líšiť podľa typu buniek ako aj v rovnakej bunke, ale pri rôznych podnetoch.

Zvýšená expresia Bcl-2 vo vnútornej dráhe môže viesť k inhibícii apoptózy, sprostredkovanej vonkajšou dráhou [Ola a kol., 2011]. Naopak, TNF α môže zvýšiť expresiu NF κ B a stimulovať tak antiapoptotické proteíny Bcl-2 rodiny [Ghobrial a kol., 2005].

Mnohé chorobné stavy vznikajú v dôsledku poruchy regulácie apoptózy jednak jej nadmernou indukciou (napr. neurodegeneratívne ochorenia, alebo AIDS) alebo naopak jej regresiou (napr. malignity spojené s mutáciou p53 alebo nadprodukciou viacerých antiAP proteínov). Nádorové postihnutie je všeobecný názov pre skupinu chorôb spôsobených nekontrolovaným množením nádorových buniek v najrôznejších telových orgánoch a tkanivách. Vzniká v dôsledku akumulácie mutácií v dôležitých regulačných génoch organizmu. Je charakterizované vznikom zhubných (malígnych) buniek, ktoré získali schopnosť prenikať do okolitých tkanív (invázia), kde tvoria vzdialené nádory (metastázy). Toto je klinická definícia zhubného nádoru. Keďže nádorové ochorenie vzniká akumuláciou genetických zmien v bunkových génoch, je logické, že ich s predlžovaním veku pribúda [Kaušitz a kol., 2003].

Nádorové bunky sa často vyznačujú vlastnosťami, ktoré poukazujú na poruchy v molekulových dráhach, ktoré vedú k prirodzenej apoptóze. Medzi typické poruchy, ktoré sa vyskytujú v nádorových bunkách, patria:

- ♦ zvýšená expresia prirodzených inhibítorov apoptózy, ako sú produkty génov *Bcl-2* a *Bcl-xL*,
- ♦ znížená expresia apoptózu indukujúcich proteínov Bax a Bid,
- ♦ inaktivácia nádorového supresorového génu *p53* genetickou mutáciou,
- ♦ inhibícia signálnej dráhy sprostredkovaná rodinou faktorov nádorovej nekrózy (TNF), dráhou TRAIL a neprítomnosťou receptora smrti Fas,
- ♦ aktivácia signálnej dráhy AKT/PKB (upregulácia *Bcl-2*),
- ♦ aktivácia inhibítorov apoptotických bielkovín (IAP) [Kaušitz a kol., 2003].

Pravdepodobne všetky typy nádorov majú schopnosť nadobudnúť odolnosť voči programovanej smrti bunky. Nádorové bunky získavajú rezistenciu na apoptózu vďaka nadmernej aktivácii antiapoptotických proteínov alebo mutáciou, či zníženou aktiváciou proapoptotických proteínov [Jin a El-Deiry, 2005].

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **4**, 239–257 (1972).
- [2] Vogt, C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte. (Alytes obstetricians) 130 (Jent und Gassman, 1842).
- [3] Glucksmann, A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* **26**, 59–86 (1951).
- [4] Saunders, J. W. Jr. Death in embryonic systems. *Science* **154**, 604–612 (1966).
- [5] Kerr, J. F. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J. Pathol. Bacteriol.* **90**, 419–435 (1965).
- [6] Wyllie, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555–560 (1980).
- [7] Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251–306 (1980).
- [8] Enari, M. *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43–50 (1998).
- [9] Jones DP, McConkey DJ, Nicotera P, Orrenius S. Calcium-activated DNA fragmentation in rat liver nuclei. *J Biol Chem.* **264**, 6398–403 (1989).
- [10] Horvitz, H. R. Nobel lecture. Worms, life and death. *Biosci. Rep.* **5**, 239–303 (2003).
- [11] Strasser, A., O'Connor, L., & Dixit, V. M. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 217–245 (2000).
- [12] Wyllie AH. Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol.* **153**(4):313–6 (1987).
- [13] Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M. Apoptosis in cancer--an update. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(10):4873–8.
- [14] Lemasters JJ. Modulation of mitochondrial membrane permeability in pathogenesis, autophagy and control of metabolism. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22 Suppl 1: 31–7.
- [15] Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2000; 96(2): 271–6.
- [16] Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 2008; 20;27(48):6194–206.
- [17] Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ, Los M. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet.* 2009 Aug;46(8):497–510].
- [18] Salvesen GS, Riedl SJ. Caspase mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 2008;615:13–23.
- [19] Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999;274:20049–52.
- [20] Wang ZB, Liu YQ, Cui YF. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int.* 2005;29:489–96.
- [21] Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 231–241.
- [22] Lüthi, A.U. a Martin, S.J. 2007. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 14: 641–650.
- [23] Communal, C., Sumandea, M., de Tombe, P., Narula, J., Solaro, R.J., Hajjar, R.J. 2002. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc. Natl Acad. Sci.* 99: 6252–6256.
- [24] Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391: 43–50.
- [25] Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007; 14, 1237–1243.
- [26] Ura, S., Masuyama, N., Graves, J.D., Gotoh, Y. 2001. Caspase cleavage of MST1 promotes nuclear translocation and chromatin condensation. *Proc. Natl Acad. Sci.* 98: 10148–10153.
- [27] Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. *N Engl J Med.* Cell death. 2009; 361(16): 1570–83.
- [28] Fabianová E. 2010. Diplomová práca: Apoptóza vo vzťahu k rozvoju nádorových ochorení a rezistencii nádorov na cytostatiká.
- [29] Lee SH, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Assisi F, Chiu H. The synergistic anti-proliferative effect of gamma-interferon and human lymphotoxin. *J Immunol.* 1984 Sep;133(3):1083–6.
- [30] Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol.* 2003 Oct 15;66(8):1403–8.
- [31] Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 1994; **79**: 189–192.

- [32] Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; **13**: 1899–1911
- [33] Nguyen M, Millar DG, Yong VW, Korsmeyer SJ, Shore GC. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* 1993; **268**: 25265–25268.
- [34] De Jong D, Prins FA, Mason DY, Reed JC, van Ommen GB, Kluin PM. Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Res* 1994; **54**: 256–260.
- [35] Thomadaki H and Scorilas A. BCL2 FAMILY OF APOPTOSIS-RELATED GENES: Functions and Clinical Implications in Cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 43(1):1–67 (2006).
- [36] **Youle, R.J. a Strasser, A.** 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 47-59.
- [37] Zha, H., Aime-Sempe, C., Sato, T., Reed, J.C. 1996a. Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J. Biol. Chem.* 271: 7440–7444.
- [38] Gao, S., Fu, W., Durrenberger, M., De Geyter, C., Zhang, H. 2005. Membrane translocation and oligomerization of hBok are triggered in response to apoptotic stimuli and Bnip3. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 1015–1024.
- [39] Šrámek M. Apoptóza, mechanizmy, metody studia. Masarykova Univerzita, Brno 2010.
- [40] Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 1986; **47**: 19–28.
- [41] Haldar S, Jena N, DuBois GC, Takayama S, Reed JC, Fu SS, Croce CM. Purification and characterization of the bcl-2 protein. *Arch Biochem Biophys* 1994; **315**: 483–488.
- [42] Kirkin V, Joos S, Zornig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1644**: B229–B249.
- [43] Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; **275**: 1129–1132.
- [44] Haldar S, Jena N, Croce CM. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4507–4511.
- [45] Akgul C, Turner PC, White MR, Edwards SW. Functional analysis of the human MCL-1 gene. *Cell Mol Life Sci* 2000; **57**: 684–691.
- [46] Shimazu, T., Degenhardt, K., Nur-E-Kamal, A., Zhang, J., Yoshida, T., Zhang, Y., Mathew, R., White, E., Inouye, M. 2007. NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition. *Genes Dev.* 21: 929–941.
- [47] Strasser, A. 2005. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 189-200.
- [48] Pacifico F, Leonardi A. NF-kappaB in solid tumors. *Biochem Pharmacol.* 2006 Oct 30;72(9):1142-52.
- [49] Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006 Oct 30;25(51):6680-4.
- [50] Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 1986 Dec 26;47(6):921-8.
- [51] Escárcega RO, Fuentes-Alexandro S, García-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2007 Mar;19(2):154-61.
- [52] Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest.* 2005, 115(10):2625-32.
- [53] Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M: The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* 189:1839–1845, 1999.
- [54] Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gelinas C. To be or not to be: NF-kB is the answer – role of Rel/NF-kB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 2003;22:8961–82.
- [55] Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(8): 5785-99.
- [56] Perkins ND, Felzien LK, Betts JC, Leung K, Beach DH, Nabel GJ.Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science.* 1997; 275(5299): 523-7.
- [57] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors.*Oncogene.* 1999; 18(49): 6853-66.
- [58] Biswas DK, Cruz AP, Gansberger E, Pardee AB. Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(15): 8542-7.
- [59] Kiriakidis S, Andreacos E, Monaco C, Foxwell B, Feldmann M, Paleolog E. VEGF expression in human macrophages is NF-kappaB-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha and a kinase-defective form of the IkappaB kinase 2. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 4): 665-74.
- [60] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002; 296: 1655-1657.
- [61] Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55(3): 178-94.

- [62] Caroppi P, Sinibaldi F, Fiorucci L, Santucci R. Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein. *Curr Med Chem*. 2009;16(31):4058-65.
- [63] Tognon R, Gasparotto EP, Leroy JM, Oliveira GL, Neves RP, Carrara Rde C, Kashima S, Covas DT, Santana M, Souto EX, Zanichelli MA, Velano CE, Simões BP, Alberto FL, Miyashiro K, de Souza AM, Amarante-Mendes GP, de Castro FA. Differential expression of apoptosis-related genes from death receptor pathway in chronic myeloproliferative diseases. *J Clin Pathol*. 2011 Jan;64(1):75-82.
- [64] Landowski TH, Moscinski L, Burke R, et al. CD95 antigen mutations in hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2001; 42: 835-846.
- [65] Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. 2002; 296: 1635-1636.
- [66] Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. 1984; 226: 1097-1099.
- [67] Konopleva M, Zhao S, Hu W, Jiang S, Snell V, Weidner D, Jackson CE, Zhang X, Champlin R, Estey E, Reed JC, Andreeff M. The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells. *Br J Haematol*. 2002 Aug;118(2):521-34.
- [68] Grütter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol*. 2000; 10(6): 649-55.
- [69] Kaušitz J, Altaner Č. a kolektív autorov. 2003 *Onkológia*. Prvé vydanie. Vydala VEDA, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied v Bratislave. 239-267 s. ISBN: 80-224-0711-9.
- [70] Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. 2005; 4(2): 139-63.
- [71] Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2007 Jan;14(1):32-43.
- [72] Šramek M. Apoptóza, mechanizmy, metody studia. Masarykova Univerzita, Brno 2010: (8-12).
- [73] Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Mar;9(3):231-41.
- [74] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.
- [75] Blandizzi C, Gionchetti P, Armuzzi A, Caporali R, Chimenti S, Cimaz R, Cimino L, Lapadula G, Lionetti P, Marchesoni A, Marcellusi A, Mennini FS, Salvarani C, Girolomoni G. The role of tumour necrosis factor in the pathogenesis of immune-mediated diseases. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2014 Jan-Mar;27(1 Suppl):1-10.
- [76] MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett*. 2003 Apr 4;139(2-3):89-97.
- [77] Chauhan PS, Bhushan B, Singh LC, Mishra AK, Saluja S, Mittal V, Gupta DK, Kapur S. Expression of genes related to multiple drug resistance and apoptosis in acute leukemia: response to induction chemotherapy. *Exp Mol Pathol*. 2012 Feb;92(1):44-9.
- [78] Gurlek U, Demiroz Abakay C, Ozkan L, Saraydaroglu O, Kurt M, Kahraman Çetintas S. The evaluation of bcl-2 expression as a prognostic marker in early stage laryngeal cancer. *Tumori*. 2013 Nov-Dec;99(6):682-8.
- [79] Tothova E, Fricova M, Stecova N, Kafkova A, Elbertova A. High expression of Bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Neoplasma*. 2002; 49: 141-144.
- [80] Murata M, Nagai M, Fujita M, Ohmori M, Takahara J. Calphostin C synergistically induces apoptosis with VP-16 in lymphoma cells which express abundant phosphorylated Bcl-2 protein. *Cell Mol Life Sci*. 1997; 53: 737-743.
- [81] Deng X, Kornblau SM, Ruvolo PP, May WS Jr. Regulation of Bcl2 phosphorylation and potential significance for leukemic cell chemoresistance. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001; 28: 30-37.
- [82] Von Ahsen O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD. Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol*. 2000; 150: 1027-1036.
- [83] Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Miyashita T, Wang HG, Reed JC. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol*. 1994; 145: 1323-1336.
- [84] Droin NM, Green DR. Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 1;1644(2-3):179-88.
- [85] Colitti M. BCL-2 family of proteins and mammary cellular fate. *Anat Histol Embryol*. 2012 Aug;41(4):237-47.
- [86] Hamnér S, Skoglösa Y, Lindholm D. Differential expression of bcl-w and bcl-x messenger RNA in the developing and adult rat nervous system. *Neuroscience*. 1999;91(2):673-84.
- [87] Haynik DM, Prayson RA. Immunohistochemical expression of Bcl-2, Bcl-x, and Bax in follicular carcinomas of the thyroid. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006 Dec;14(4):417-21.
- [88] Ma X, Zhao Y, Li Y, Lu H, He Y. Relevance of Bcl-x expression in different types of endometrial tissues. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010 Feb 23;29:14.
- [89] Castilla C, Congregado B, Chinchón D, Torrubia FJ, Japón MA, Sáez C. Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak. *Endocrinology*. 2006 Oct;147(10):4960-7.
- [90] Williams J, Lucas PC, Griffith KA, Choi M, Fogoros S, Hu YY, Liu JR. Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease. *Gynecol Oncol*. 2005 Feb;96(2):287-95.

- [91] Reeve JG, Xiong J, Morgan J, Bleehe NM. Expression of apoptosis-regulatory genes in lung tumour cell lines: relationship to p53 expression and relevance to acquired drug resistance. *Br J Cancer*. 1996 May;73(10):1193-200.
- [92] Biroccio A, Benassi B, D'Agnano I, D'Angelo C, Buglioni S, Mottolese M, Ricciotti A, Citro G, Cosimelli M, Ramsay RG, Calabretta B, Zupi G. c-Myb and Bcl-x overexpression predicts poor prognosis in colorectal cancer: clinical and experimental findings. *Am J Pathol*. 2001 Apr;158(4):1289-99.
- [93] Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993; 74(4): 609-619.
- [94] Kaneuchi M, Yamashita T, Shindoh M, Segawa K, Takahashi S, Furuta I, Fujimoto S, Fujinaga K. Induction of apoptosis by the p53-273L (Arg→Leu) mutant in HSC3 cells without transactivation of p21Waf1/Cip1/Sdi1 and bax. *Mol Carcinog*. 1999; 26: 44-52.
- [95] Sturm I, Kohne CH, Wolff G, Petrowsky H, Hillebrand T, Hauptmann S, Lorenz M, Dorken B, Daniel PT. Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J. Clin. Oncol*. 1999; 17: 1364-1374.
- [96] Marone M, Ferrandina G, Macchia G, Mozzetti S, de Pasqua A, Benedetti-Panici P, Mancuso S, Scambia G. Bcl-2, Bax, Bcl-x(L) and Bcl-x(S) expression in neoplastic and normal endometrium. *Oncology*. 2000; 58: 161-168.
- [97] Gil J, Yamamoto H, Zapata JM, Reed JC, Perucho M. Impairment of the proapoptotic activity of Bax by missense mutations found in gastrointestinal cancers. *Cancer Res*. 1999; 59: 2034-2037.
- [98] Jaafar H, Abdullah S, Murtey MD, Idris FM. Expression of Bax and Bcl-2 in tumour cells and blood vessels of breast cancer and their association with angiogenesis and hormonal receptors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(8):3857-62.
- [99] Watanabe J, Kushihata F, Honda K, Mominoki K, Matsuda S, Kobayashi N. Bcl-xL overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2002; 21: 515-519.
- [100] Gobe G, Rubin M, Williams G, Sawczuk I, Buttyan R. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas. *Cancer Invest*. 2002; 20: 324-332.
- [101] Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol*. 2002 Nov;4(11):842-9.
- [102] Nakano, K. a Vousden, K. H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell*. 2001; 7:683-694.
- [103] Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, S.J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*. 1996; 87:619–628.
- [104] Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.-C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., Cheng, E.H.-Y. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nature Cell Biol*. 2006; 8:1348–1358.
- [105] Janssens S, Tinel A. The PIDDosome, DNA-damage-induced apoptosis and beyond. *Cell Death Differ*. 2012 Jan;19(1):13-20.
- [106] Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis – the p53 network. *J. Cell Sci*. 2003; 116, 4077-4085.
- [107] Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*. 2003 Mar;11(3):577-90.
- [108] Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med*. 2010 Feb;9(45):145-52
- [109] Liang Z, Liu J, Feng Z. The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell & Bioscience*. 2013; 3(9):1-10.
- [110] Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(5):402-12.
- [111] Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, Yang C, Wang J, Brennan J, MacLean KH, Han J, Chittenden T, Ihle JN, McKinnon PJ, Cleveland JL, Zambetti GP. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 4(4):321-8, 2003.
- [112] Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 277(5):3247-57, 2002.
- [113] Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 282(5387):290-3, 1998.
- [114] Moroni MC, Hickman ES, Denchi EL, Caprara G, Colli E, Cecconi F, Muller H, Helin K. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* 3(6):552-8, 2001.
- [115] Speidel D. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol* 20(1):14-24, 2010.
- [116] Wolff S, Erster S, Palacios G, Moll UM. p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. *Cell Res* 18(7):733-44, 2008.
- [117] Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 309(5741):1732-5, 2005.
- [118] Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G,

- Blomgren K, Tavernarakis N, Codogno P, Cecconi F, Kroemer G. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* 10(6):676-87, 2008.
- [119] Zhang XD, Franco A, Myers K, Gray C, Nguyen T, Hersey P. Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res.* 1999 Jun 1;59(11):2747-53.
- [120] Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity.* 1997 Dec;7(6):821-30.
- [121] Monleón I, Martínez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasiera P, Taulés M, Iturralde M, Piñeiro A, Larrad L, Alava MA, Naval J, Anel A. Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol.* 2001 Dec 15;167(12):6736-44.
- [122] Zhang S, Yu D. PI(3)K king apart PTEN's role in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010 Sep 1;16(17):4325-30.
- [123] Chen X, Thakkar H, Tyan F, Gim S, Robinson H, Lee C, Pandey SK, Nwokorie C, Onwudiwe N, Srivastava RK. Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. *Oncogene.* 2001; 20: 6073-83.
- [124] Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 1998;67:481–507.
- [125] Guillemet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A et al. The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of Gprotein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8292– 8297.
- [126] Luo J, Cantley LC. The negative regulation of phosphoinositide 3-kinase signaling by p85 and its implication in cancer. *Cell Cycle* 2005;4:1309–1312.
- [127] Wang DS, Ching TT, St Pyrek J et al. Biotinylated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate as affinity ligand. *Anal Biochem* 2000;280:301–307.
- [128] Nagle JA, Ma Z, Byrne MA, White MF, Shaw LM. Involvement of insulin receptor substrate 2 in mammary tumor metastasis. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 9726-35.
- [129] Zapata JM, Pawlowski K, Haas E, et al. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *J Biol Chem.* 2001; 276: 24242-24252.
- [130] Nesbit CE, Grove LE, Yin X, Prochownik EV. Differential apoptotic behaviors of c-myc, N-myc, and L-myc oncoproteins. *Cell Growth Differ.* 1998 Sep;9(9):731-41.
- [131] Kato GJ, Barrett J, Villa-Garcia M, Dang CV. An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Mol Cell Biol.* 1990 Nov;10(11):5914-20.
- [132] Tansey WP. Mammalian MYC Proteins and Cancer. Hindawi Publishing corporation. *New Journal of Science.* Volume 2014, Article ID 757534, 27 pages.
- [133] Pelengaris S, Khan M, Evan GI. Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell.* 2002; 109: 321-34.
- [134] Bouchard C, Marquardt J, Brás A, Medema RH, Eilers M. Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J.* 2004 Jul 21;23(14):2830-40.
- [135] Pedersen MØ, Gang AO, Poulsen TS, Knudsen H, Lauritzen AF, Nielsen SL, Gang UO, Nørgaard P. Double-hit BCL2/MYC translocations in a consecutive cohort of patients with large B-cell lymphoma - a single centre's experience. *Eur J Haematol.* 2012 Jul;89(1):63-71.
- [136] Nieminen AI, Partanen JI, Hau A, Klefstrom J. c-Myc primed mitochondria determine cellular sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *EMBO J.* 2007; 26(4): 1055-67.
- [137] Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell.* 2004; 14: 277-87.
- [138] Wang Q, Wang X, Hernandez A, Hellmich MR, Gatalica Z, Evers BM. Regulation of TRAIL expression by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3 pathway in human colon cancer cells. *J Biol Chem.* 2002; 277: 36602-10.
- [139] S.R. Wiley, K. Schooley, P.J. Smolak, et al, Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis, *Immunity* 3 (1995) 673–682.
- [140] Prasad S, Kim JH, Gupta SC, Aggarwal BB. Targeting death receptors for TRAIL by agents designed by Mother Nature. *Trends Pharmacol Sci.* 2014 Oct;35(10):520-536.
- [141] Wu GS. TRAIL as a target in anti-cancer therapy. *Cancer Lett.* 2009 Nov 18;285(1):1-5.
- [142] Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kB signaling pathways. *Nat Immunol.* 2011 Jul 19;12(8):695-708.
- [143] Arosio P, Levi S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Aug;1800(8):783-92.
- [144] Sun SC. Non-canonical NF-kB signaling pathway. *Cell Res.* 2011 Jan;21(1):71-85.
- [145] Crowell JA, Steele VE, Fay JR. Targeting the AKT protein kinase for cancer chemoprevention. *Mol Cancer Ther.* 2007 Aug;6(8):2139-48.

- [146] Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci.* 2008 Feb 1;121(Pt 3):249-53.
- [147] Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Aug;6(8):635-45.
- [148] Bröker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res.* 2005 May 1;11(9):3155-62
- [149] Cowling V, Downward J. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ.* 2002 Oct;9(10):1046-56.
- [150] Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer.* 2009 Aug;9(8):550-62.
- [151] YIN Y, Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene.* 2008 Sep 18;27(41):5443-53.
- [152] SHAW RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature.* 2006 May 25;441(7092):424-30.
- [153] Fulda S. Shifting the balance of mitochondrial apoptosis: therapeutic perspectives. *Front Oncol.* 2012 Oct 8;2:121.
- [154] Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, Whitlock BB, Frasca SC, Borregaard N, Marrack P, Bratton DL, Henson PM. Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem.* 2004 May 14;279(20):21085-95. Epub 2004 Feb 6.
- [155] Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2011 May;351(1-2):41-58.
- [156] Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, and Huang DC. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 2005 19: 1294–1305.
- [157] Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem.* 1999 Jan 22;274(4):2225-33.
- [158] Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell.* 2005 Feb 4;17(3):393-403.
- [159] Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol.* 2001 Jun 11;153(6):1265-76.
- [160] Ghatage D, Gosavi S, Ganvir S. Apoptosis (Molecular Mechanism). LAP LAMBERT Academic Publishing, Germany. 2014.
- [161] Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol* 1967;33:437–449.
- [162] Danielle Glick, Sandra Barth, Kay F. Macleod. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010 May; 221(1): 3–12.
- [163] Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2. *Autophagy* 2008;4:510–512.
- [164] Flemming W. Ueber die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graf'scher Follikel. *Arch Anat EntwGesch.* 1885; 221-244.
- [165] Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* 2008 Jul;15(7):1153-62.
- [166] McIntosh JR. Cell biology. Microtubule catastrophe. *Nature* 1984; 312: 196–197.
- [167] Lidong Zhang and Bingliang Fang. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Therapy* (2005) 12, 228–237.
- [168] Benn SC, Woolf CJ. Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Sep;5(9):686-700.

Typ vzdelávacieho dokumentu:

Elektronické vysokoškolské skriptá

Autor:

RNDr. Jozef Hatok, PhD.

Vydavateľ:

Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Počet strán:

59

ISBN:

978-80-8187-008-8

EAN:

9788081870088