

Proteinske kinaze i njihovi inhibitori u terapiji raka

Strukar, Mateja

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:650429>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-04**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za kemiju

Mateja Strukar

PROTEINSKE KINAZE I NJIHOVI INHIBITORI U TERAPIJI RAKA

Završni rad

Split, 2022.

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za kemiju

Mateja Strukar

PROTEINSKE KINAZE I NJIHOVI INHIBITORI U TERAPIJI RAKA

Završni rad

Split, 2022.

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom doc. dr. sc. Viljemke Bučević Popović, predan je na ocjenu Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnice biologije i kemije (*univ. bacc. biol. et chem.*).

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za kemiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

PROTEINSKE KINAZE I NJIHOVI INHIBITORI U TERAPIJI RAKA

Mateja Strukar

SAŽETAK

Proces fosforilacije jedan je od najčešćih metoda regulacije ciljnih proteina koja omogućuje normalnu staničnu komunikaciju te doprinosi održavanju homeostaze. Odvija se pomoću proteinskih kinaza koje izvršavaju bitne uloge u gotovo svim staničnim signalnim putevima, uključujući staničnu proliferaciju, diferencijaciju, migraciju, apoptozu te metabolizam. Promijenjena aktivnost većine proteinskih kinaza, s naglaskom na proteinske tirozin-kinaze, uočena je kod mnogih ljudskih bolesti, osobito tumorskih. Upravo zato, ova vrsta enzima postala je središnja meta farmaceutske industrije za razvoj selektivnih inhibitora koji bi se mogli koristiti u liječenju takvih oboljenja. U ovom radu obrađeno je djelovanje proteinskih kinaza, s naglaskom na tirozin-kinaze, njihova signalizacija i uloga u zdravim i malignim stanicama. Također su predstavljeni pojedini inhibitori tirozin-kinaza te njihova uloga u liječenju raznih bolesti.

Ključne riječi: fosforilacija, signalizacija, proteinske kinaze, tirozin-kinaze, rak, inhibitori, lijekovi

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: 24 stranice, 15 grafičkih prikaza, 2 tablice i 26 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: Dr. sc. Viljemka Bučević Popović, *docentica*

Ocjenjivači: Dr. sc. Viljemka Bučević Popović, *docentica*

Dr. sc. Matilda Šprung, *docentica*

Dr. sc. Barbara Soldo, *docentica*

Rad prihvaćen: rujan, 2022.

Basic documentation card

University of Split

B. Sc. Thesis

Faculty of Science

Department of Chemistry

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

PROTEIN KINASES AND THEIR INHIBITORS IN CANCER THERAPY

Mateja Strukar

ABSTRACT

The process of phosphorylation is one of the most common methods of regulating target proteins, as it allows normal cellular communication and contributes to the maintenance of homeostasis. It occurs with the help of protein kinases, which play important roles in most cellular signaling pathways, including cellular proliferation, differentiation, migration, apoptosis and metabolism. Altered activity of most protein kinases, with an emphasis on the protein tyrosine kinases, is observed in many human diseases, especially tumors. That is why this type of enzyme has become the main target of the pharmaceutical industry for the process of developing selective inhibitors, which could be used as treatment against such diseases. This thesis examines the impact of protein kinases, with the emphasis on the tyrosine kinases, their signaling and their role in both healthy and malignant cells. Individual inhibitors of tyrosine kinases and their role in the treatment of various diseases are also presented.

Keywords: phosphorylation, signaling, protein kinase, tyrosine kinase, cancer, inhibitors, drugs

Thesis deposited in library of Faculty of Science, University of Split

Thesis consist of: 24 pages, 15 figures, 2 tables and 26 references, original in: Croatian

Mentor: Viljemka Bučević Popović, Ph.D. *Assistant Professor*

Reviewers: Viljemka Bučević Popović, Ph.D. *Assistant Professor*

Matilda Šprung, Ph.D. *Assistant Professor*

Barbara Soldo, Ph.D. *Assistant Professor*

Thesis accepted: September, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. RAZRADA TEME	1
2.1. FOSFORILACIJA	1
2.1.1. Proces fosforilacije proteina	1
2.1.2. Prednosti fosforilacije	3
2.2. PROTEINSKE KINAZE	3
2.2.1. Struktura proteinskih kinaza	3
2.2.2. Podjela proteinskih kinaza	6
2.3. TIROZIN-KINAZE	8
2.3.1. Podjela tirozin-kinaza	9
2.3.2. Djelovanje receptorskih tirozin-kinaza	10
2.3.3. Djelovanje nerekceptorskih tirozin-kinaza	12
2.3.4. Signalizacija i rak	12
2.3.5. Inhibitori tirozin-kinaza	16
3. ZAKLJUČAK.....	21
4. LITERATURA	22

1. UVOD

Protein-kinaze su enzimi koji kataliziraju prijenos terminalne fosforilne skupine ATP-a na akceptor koji je hidroksilna skupina bočnih ogranaka serina, treonina ili tirozina nekog proteina. Trenutno je istraženo nekoliko stotina protein-kinaza te zasigurno tvore jednu od najvećih proteinskih porodica kod eukariota (Cooper i Hausman, 2004). Brojnost ove skupine enzima omogućuje obradu i povezivanje složenih informacija iz vanjske okoline te biološku regulaciju usmjerenu prema specifičnome tkivu ili supstratu. Procesom fosforilacije, kao najčešćim tipom reverzibilne kovalentne modifikacije, kinaze utječu na aktivnost ciljnih proteina. Zbog svoje mogućnosti djelovanja na više od jednog proteina, zastupljene su u većini metaboličkih puteva eukariotskih stanica. Iako su u organizmu najmanje zastupljene tirozinske protein-kinaze, one zauzimaju glavnu ulogu u regulaciji i kontroli rasta stanice. Poremećaji u aktivnosti istih dovode do nekontrolirane proliferacije i diferencijacije karakteristične za tumorske stanice (Berg i sur., 2013). Cilj ovog rada je predstaviti ulogu i način djelovanja protein-kinaza kao i opisati zašto su postale mete lijekova i predmet interesa današnjih biomedicinara.

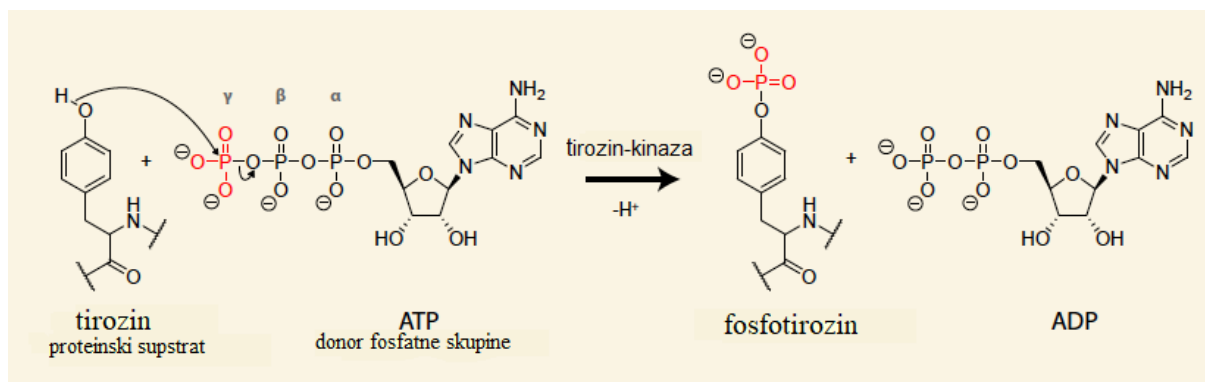
2. RAZRADA TEME

2.1. FOSFORILACIJA

2.1.1. Proces fosforilacije proteina

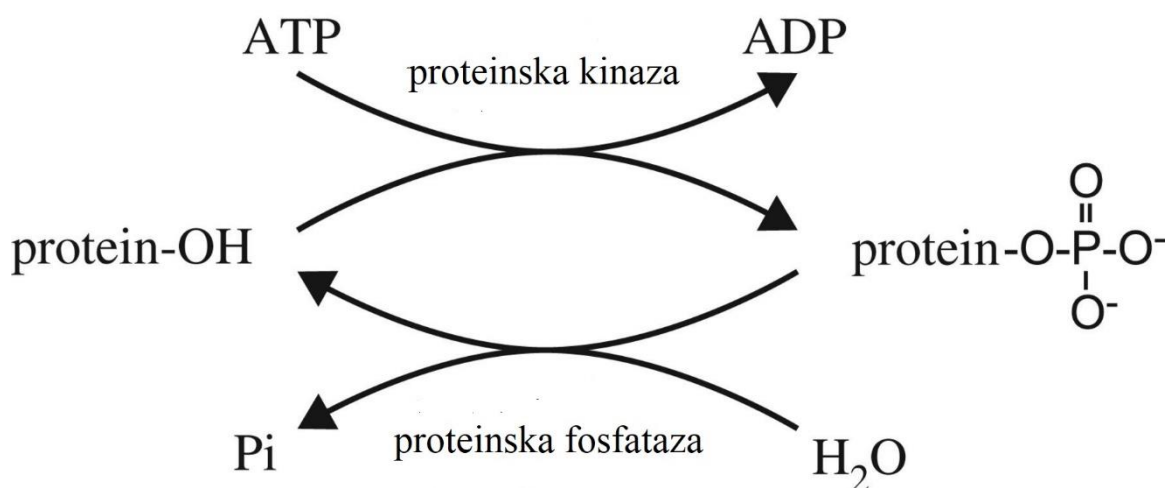
Fosforilacija je posttranslacijska modifikacija (PTM) proteina. Radi se o procesu prijenosa terminalne, gama (γ) fosfatne skupine najčešće s molekule ATP na specifični aminokiselinski ostatak. Prijenos se odvija uz pomoć proteinskih kinaza bez kojih bi reakcija tekla znatno sporije. Kod eukariota, akceptor fosfatne skupine uvijek je jedna od triju aminokiselina, koje u svom bočnom ogranku zadrže -OH skupinu (ThermoFisher Scientific, 2022). Fosforilaciju serina i treonina katalizira jedna skupina kinaza tzv. serin/treonin-protein-kinaze pri čemu nastaju odgovarajući esterificirani O-fosfoserilni ili O-fosfotreonilni ostatci, a tirozin tzv. tirozin-protein-kinaze pri čemu nastaju O-fosfotirozilni ostatci (Slika 1). Domene proteinskih kinaza koje vezuju proteine podložne fosforilaciji, nalaze se unutar stanica gdje je ujedno i obilje donorskih ATP molekula. Iako se radi o reverzibilnom procesu kod kojeg ne dolazi do stvaranja novih kovalentnih veza između regulatornih molekula i proteina, fosforilacija se uvriježeno ubraja pod vrste kovalentnih modifikacija. Zahvaljujući reverzibilnoj regulaciji, omogućuje brzi stanični odgovor na raznovrsne signale iz okoline ne zahtijevajući stvaranje ili razgradnju novih enzima. Veliki broj metaboličkih procesa, uključujući procese staničnog

ciklusa, rasta, diferencijacije i apoptoze, koristi upravo fosforilaciju kao učinkovit način regulacije aktivnosti ciljnih proteina (Murray i sur., 2011). Čak 30% eukariotskih proteina je fosforilirano (Berg i sur., 2013). Regulacija samih kinaza također se postiže fosforilacijom, bilo putem autofosforilacije ili putem drugih kinaza. Dodatak fosfata mijenja karakteristike proteina, najčešće uz promjenu same strukture proteina. Povratnom reakcijom, hidrolizom fosfatne skupine, koju kataliziraju proteinske fosfataze, enzim se vraća u svoju izvornu konformaciju te je spreman za odgovor na novi podražaj (Slika 2).



Slika 1. Prikazana je reakcija fosforilacije koja uključuje prijenos fosforilne skupine (crveno) s gama (γ) položaja donorske molekule ATP-a na hidroksilnu skupinu proteinskog supstrata. U ovom primjeru, do prijenosa dolazi na bočni lanac tirozina. Ovu reakciju katalizira protein tirozin-kinaza.

(preuzeto i prilagođeno s mrežne stranice LabXchange. Protein Phosphorylation. o kojoj se potpuna informacija s linkom može naći na poveznici na kraju popisa literature)



Slika 2. Prikazana je reverzibilna reakcija katalizirana proteinskom kinazom i proteinskom fosfatazom.

(preuzeto i prilagođeno iz D. G. Hardie, Journal of the royal society interface **15** (2018) 138)

2.1.2. Prednosti fosforilacije

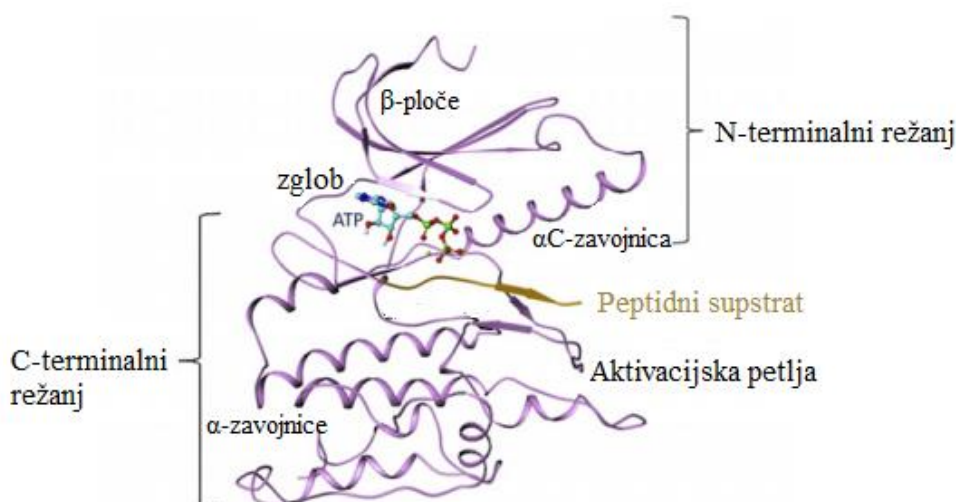
Puno je razloga zbog kojih je proces fosforilacije najučestaliji oblik kontrole aktivnosti proteina. Prije svega, reakcija je termodinamički povoljna. Velike količine energije oslobađaju se hidrolizom ATP-a, molekule supstrata koji služi kao donor fosforilne skupine u procesu fosforilacije. Razlog tomu su slabe interakcije između fosfora i kisika povezanih fosfoanhidridnom vezom u molekuli ATP-a za koje je potrebno uložiti malu količinu energije kako bi pukle, dok s druge strane novoformirane jake kovalentne veze između fosfora i nukleofilnog atoma kisika uzrokuju oslobađanje velike količine energije (LabXchange, 2022). Također, u korist fosforilaciji ide i neprestano recikliranje molekule ATP što je čini lako dostupnom u našim stanicama (Hardie, 2018). Od iznimne je važnosti i sama struktura fosforilne skupine. Tetraedarska geometrija omogućuje strogo usmjerenje vodikovih veza što rezultira stvaranjem točno specifičnih interakcija. Nosi dva negativna naboja koja uzrokuju promjenu konformacije modificiranog proteina što posljedično kontrolira vezivanje supstrata i katalitičku aktivnost proteina (Secko, 2003). Prednost je i kinetika same reakcije koja se može prilagoditi ovisno o potrebama organizma. U skladu s tim, fosforilacija se može dogoditi u nekoliko milisekundi, ali i u nekoliko sati (Berg i sur., 2013).

2.2. PROTEINSKE KINAZE

2.2.1. Struktura proteinskih kinaza

Zahvaljujući kristalografskim istraživanjima, danas nam je dostupno približno 1500 kristalnih struktura protein-kinaza (Schwartz i Murray, 2011). Protein-kinaze građene su od regulacijskih i katalitičkih podjedinica. Disocijacijom kompleksa i oslobađanjem katalitičkih podjedinica one postaju enzimski aktivne (Berg i sur., 2013). Katalitičke domene su visoko očuvane među kinazama, no svaka kinaza je individualna s obzirom na sastav podjedinica, molekularnu masu, sposobnost autofosforilacije, vrijednost K_m za ATP i afinitet prema pojedinom supstratu (Murray i sur., 2011).

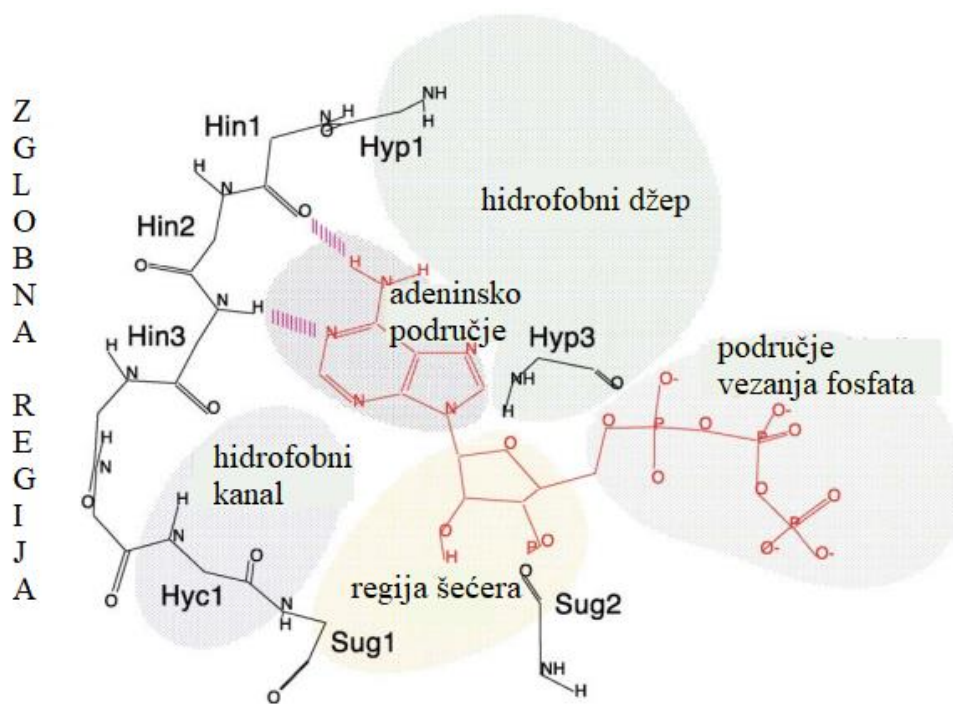
Katalitička domena (Slika 3) građena je od dva režnja. Manji N-terminalni režanj sastoji se od pet β -ploča i jedne ključne α C-zavojnice, dok se veći C-terminalni režanj sastoji većinski od α -zavojnica. Ključna α C-zavojnica svojom orijentacijom regulira kinaznu aktivnost, dok njeno kretanje iz „out“ u „in“ konformaciju regulira očuvana, ali još uvijek relativno nepoznata α C- β 4 petlja (Yeung i sur., 2020). Režnjevi su međusobno povezani zglobovom, a između režnjeva je formirana pukotina koja predstavlja ATP-vezujuće mjesto (Schwartz i Murray, 2011).



Slika 3. Prikazana je katalitička domena protein-kinaze vezana s ATP molekulom i peptidnim supstratom. Označene su strukturne značajke: N-terminalni režanj građen od β -ploča i jedne α C-zavojnice, C-terminalni režanj građen od α -zavojnica, zglob kojim su reznjevi međusobno povezani te aktivacijska petlja.

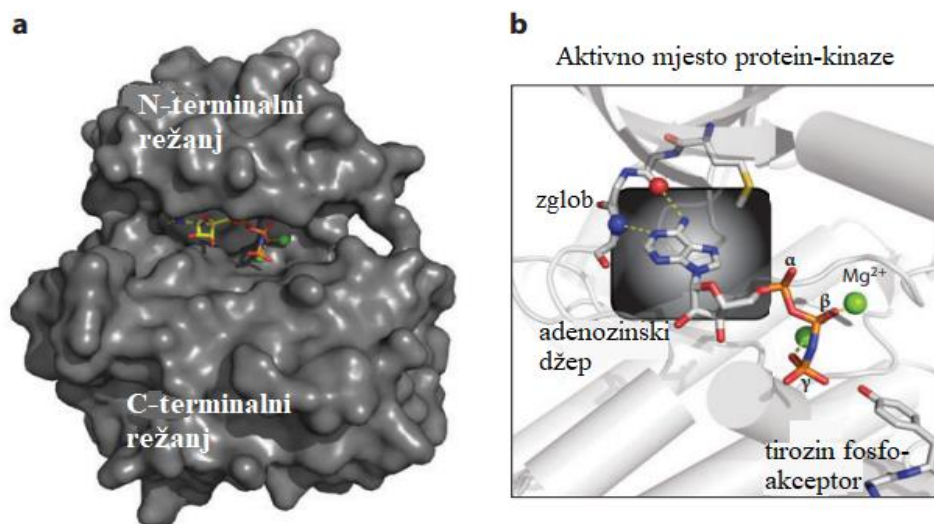
(preuzeto i prilagođeno iz P. A. Schwartz i B. W. Murray, *Bioorg. Chem.* **39** (2011) 192-210)

ATP-vezujuće mjesto (Slika 4) odjeljeno je na adeninsku regiju, regiju šećera, hidrofobni džep ili džep selektivnosti, hidrofobni kanal te regiju vezanja fosfata (Fabro i sur., 2002). U adeninskoj regiji, adeninski prsten ATP-a postiže stabilnost tvoreći vodikove veze s amidnom okosnicom zglobove regije. Regija vezanja fosfata sadrži petlju bogatu glicinom koja se veže ionskim interakcijama na neprenosive α - i β -fosfatne skupine ATP-a. Također, sadrži aktivacijsku petlju, zaslužnu za prepoznavanje peptidnog supstrata, građenu od očuvane DFG sekvence zajedno s magnezijevim ionima. Magnezijevi ioni su bitni jer se na njih veže aspartatni ostatak DFG sekvence usmjeravajući γ -fosfatnu skupinu ATP-a u položaj povoljan za prijenos (Fabro i sur., 2002, Schwartz i Murray, 2011). Ponekad se umjesto magnezijevih kationa nalaze drugi divalentni ioni metala poput Mn^{2+} (Berg i sur., 2013). Hidrofobne regije imaju ključnu ulogu u selektivnosti protein-kinaza jer sadrže regulacijske elemente kinaze. Dva aminokiselinska ostatka, lizinski ostatak i ostatak „vratar“ reguliraju dostupnost hidrofobnom džepu. Ovisno o tome sadrže li aminokiselinu s velikim ili malim bočnim ogrankom, inhibirat će odnosno dopuštati ulazak liganda u džep (Schwartz i Murray, 2011). Prostorna struktura enzima s naznačenim N- i C-terminalnim reznjevima te aktivnim mjestom prikazana je na primjeru inzulinske tirozin-kinaze na Slici 5.



Slika 4. Prikazano je ATP-vezujuće mjesto protein-kinaza. ATP je u crvenoj boji. Sug1, Hyp1 i Hyc1 su ostaci koji oblažu regiju šećera (Sug), hidrofobni džep (Hyp) i hidrofobni kanal (Hyc). Hn, regija zgloba.

(preuzeto i prilagođeno iz D. Fabbro i sur., *Pharmacology & Therapeutics* **93** (2002) 79–98)



Slika 5. Prikazana je inzulinska receptor-kinaza u kompleksu s ATP-om i malim peptidnim supstratom. a) Džep koji veže ATP unutar domene protein-kinaze leži duboko unutar pukotine koju omeđuju N-terminalni režanj, zglobne regije i C-terminalni režanj; protein-kinaza- siva površina; ATP- štapići; Mg ioni- zelene kuglice. b) Povećanje aktivnog mjesta: ključne H-veze između ATP-a i atoma glavnog lanca zgloba su istaknute iscrtkano. Gama (γ) fosfat ATP-a je

spreman za prijenos na hidroksilnu skupinu peptidnog supstrata (u ovom slučaju, akceptorski ostatak je tirozin).

(preuzeto i prilagođeno iz A. C. Dar i K. M. Shokat, *Annu. Rev. Biochem.* **80** (2011) 769-795)

2.2.2. Podjela proteinskih kinaza

Prema dosadašnjim istraživanjima genom čovjeka sadrži 518 gena zaslužnih za sintezu protein-kinaza, što je 1,7% svih ljudskih gena. Identifikacija i klasifikacija proteinskih kinaza neophodna je za razumijevanje njihove aktivnosti, ali i u konačnici za pronalazak potencijalnih aktivatora odnosno inhibitora istih. Klasifikacija proteinskih kinaza provedena je primarno usporedbom sekvenci njihovih katalitičkih domena, a dodatno je uzeta u obzir i struktura vankatalitičkih domena te njihova biološka funkcija u stanicama. Najveći broj ljudskih protein-kinaza sadrži katalitičku domenu eukariotske protein-kinaze i time pripadaju u jednu od najvećih superobitelji (ePK). Preostalih 40 gena od ukupnih 518 kodira tzv. atipične protein-kinaze čije katalitičke domene ne pokazuju sličnost eukariotskim protein-kinazama tzv. aPK. Ljudska ePK superobitelj sadrži grupe AGC (nazvana prema trima reprezentativnim obiteljima protein-kinaze A, protein-kinaze G i protein-kinaze C), CAMK (Ca^{2+} /kalmodulin-ovisne protein-kinaze), CK1 (kazein-kinaze 1), CMGC (nazvana prema kinazama ovisnim o ciklinu i njima sličnim kinazama, mitogen-aktiviranim protein-kinazama te kinazama glikogen-sintaze), STE (uključuje homologe sterilnih kinaza kvasca), TK (tirozin-kinaze), TKL (kinaze slične tirozin-kinazama) te grupu „ostalih“ unutar koje se nalaze protein-kinaze koje ne pripadaju glavnim granama ePK superobitelji (Tablica 1). Svaka grupa sastoji se od određenog broja obitelji, a svaka obitelj dijeli se na određen broj podobitelji. Također identificirano je 13 obitelji atipičnih protein-kinaza (aPK) koje se potom dijele na određen broj podobitelji (Manning i sur., 2022). Proteinske kinaze unutar iste obitelji mogu, ali ne moraju obavljati istu funkciju što ovisi o podudarnosti u građi njihovih domena i prisutnosti ili odsutnosti različitih vrsta receptora.

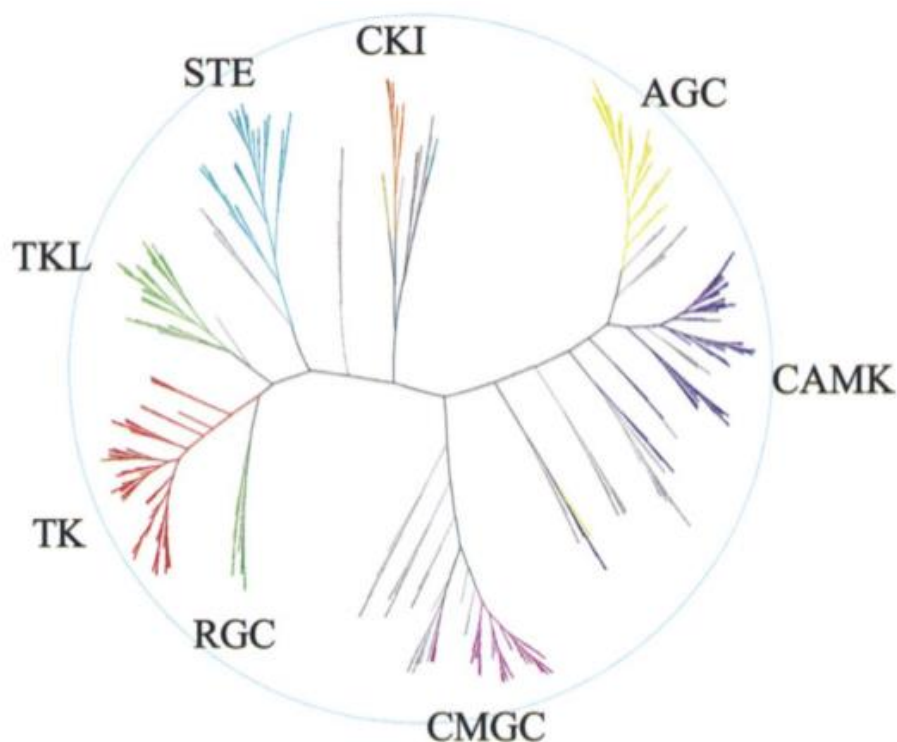
Budući da su proteinske kinaze jedne od najzastupljenijih skupina proteina kod ljudi, nije iznenađujuće da posreduju u većini staničnih procesa. Mutacije koje uzrokuju smanjenu aktivnost, ali i pretjeranu ekspresiju protein-kinaza, uzrokuju velik broj bolesti kod ljudi (Hanks, 2003). Kromosomskim lociranjem gena kinaza i usporedbom s već poznatim lokusima bolesti, ustanovilo se da 164 kinaze, svojim abnormalnim djelovanjem, uzrokuju karcinom ili posreduju u njegovom razvoju dok njih 80 sudjeluje u razvoju drugih bolesti (Manning i sur., 2022). Svakako treba izdvojiti grupu tirozin-kinaza u koju pripada najveći broj kinaza i čija je primarna funkcija posredovanje u prijenosu unutarstaničnih signala te kontrola stanične

proliferacije i diferencijacije. Iz tog razloga, kod većine tirozin-kinaza svako odstupanje od normalne aktivnosti može dovesti do karcinogeneze, odnosno razvoja raka (Esteban-Villarrubia i sur., 2020).

Tablica 1. Prikazana je podjela kinaza prema glavnim skupinama kod ljudi i modelnih organizama. Kratice: AGC- grupa nazvana prema trima reprezentativnim obiteljima protein-kinaze A, protein-kinaze G i protein-kinaze C, CAMK- grupa Ca^{2+} /kalmodulin-ovisnih protein-kinaza, CK1- grupa kazein-kinaza 1, CMGC- grupa nazvana prema kinazama ovisnim o ciklinu i njima sličnim kinazama, mitogen-aktiviranim protein-kinazama te kinazama glikogen-sintaze, STE- grupa koja uključuje homologe sterilnih kinaza kvasca, RGC- receptor vezan za gvanilat ciklazu, PDHK-piruvat dehidrogenazne kinaze, BRD- kinaze s bromodomenom, PIKK-kinaze srodne fosfatidil-inozitol-3-kinazi)

(preuzeto i prilagođeno iz G. Manning i sur., Science **298** (2002) 1912-1934)

Grupa	obitelji	podobitelji	kinaze kvasca	kinaze crva	kinaze muha	ljudske kinaze	ljudski pseudogeni	nove ljudske kinaze
AGC	14	21	17	30	30	63	6	7
CAMK	17	33	21	46	32	74	39	10
CK1	3	5	4	85	10	12	5	2
CMGC	8	24	21	49	33	61	12	3
Ostalo	37	39	38	67	45	83	21	23
STE	3	13	14	25	18	47	6	4
Tirozin kinaza	30	30	0	90	32	90	5	5
Tirozin kinazi slična	7	13	0	15	17	43	6	5
RGC	1	1	0	27	6	5	3	0
Atipična-PDHK	1	1	2	1	1	5	0	0
Atipična-Alfa	1	2	0	4	1	6	0	0
Atipična-RIO	1	3	2	3	3	3	1	2
Atipična-A6	1	1	1	2	1	2	2	0
Atipična-Ostalo	7	7	2	1	2	9	0	4
Atipična-ABC1	1	1	3	3	3	5	0	5
Atipična-BRD	1	1	0	1	1	4	0	1
Atipična-PIKK	1	6	5	5	5	6	0	0
Ukupno	134	201	130	454	240	518	106	71



Slika 6. Dendrogram na kojem je prikazano 8 grupa ePK superobitelji. Svaka grupa podijeljena je na određen broj obitelji, a svaka obitelj dijeli se na određen broj podobitelji. To u konačnici predstavlja broj od 491 ePK domene kodirane iz 478 gena. Kratice: AGC- grupa nazvana prema trima reprezentativnim obiteljima protein-kinaze A, protein-kinaze G i protein-kinaze C, CAMK- grupa Ca^{2+} /kalmodulin-ovisnih protein-kinaza, CK1- grupa kazein-kinaza 1, CMGC- grupa nazvana prema kinazama ovisnim o ciklinu i njima sličnim kinazama, mitogen-aktiviranim protein-kinazama te kinazama glikogen-sintaze, STE- grupa koja uključuje homologe sterilnih kinaza kvasca.

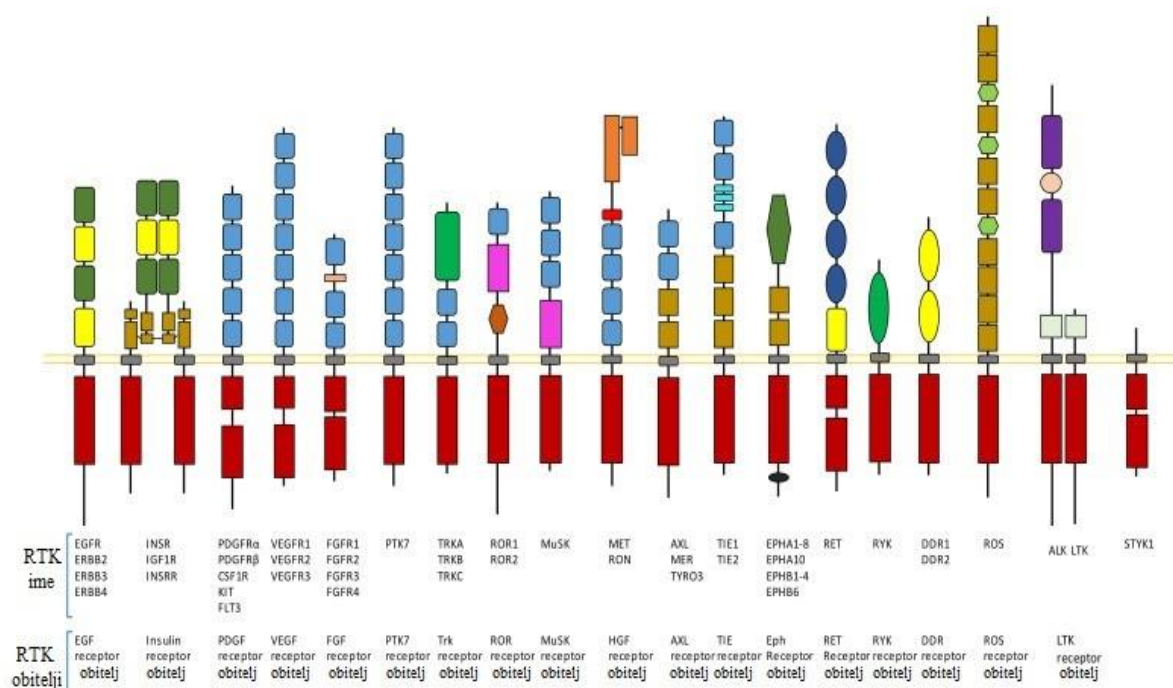
(preuzeto i prilagođeno iz G. Manning i sur., Science 298 (2002) 1912-1934)

2.3. TIROZIN-KINAZE

Tirozin-kinaze su najbrojnija superobitelj proteinskih kinaza koja, uz pomoć ATP-a, katalizira fosforilaciju tirozinskih ostataka ciljnih proteina. Važne su signalne molekule u mnogobrojnim biološkim procesima gdje svojom aktivnošću uzrokuju kaskadu reakcija bitnu za održavanje normalne stanične diferencijacije, proliferacije, migracije te kontrole programirane stanične smrti. Abnormalna ekspresija tirozin-kinaza, uzrokovana mutacijama i/ili epigenetskim promjenama, dovodi do deregulacije signalnih puteva koja u konačnici rezultira pojavom mnogih bolesti. Predstavljaju glavnu metu za razvoj terapijskih antikancerogenih lijekova jer su mnoge od njih uključene u ljudsku onkogenezu i angiogenezu (Paul i Mukhopadhyay, 2004).

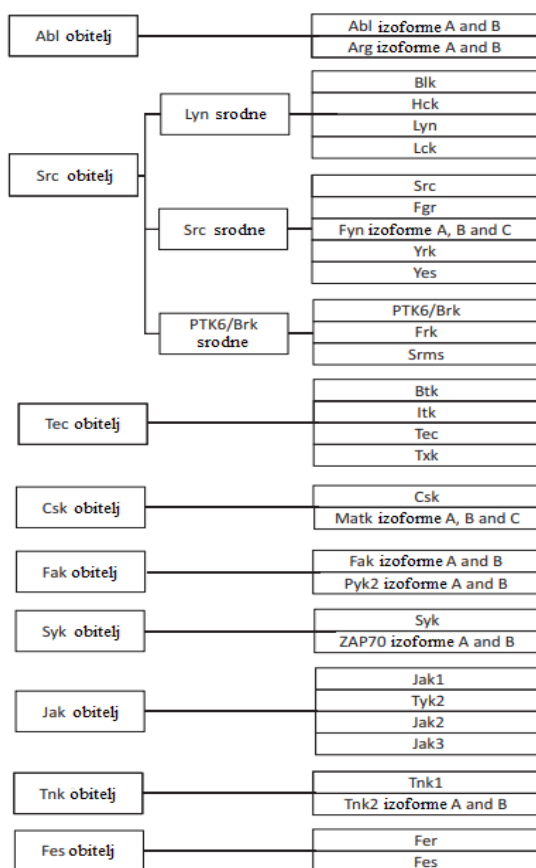
2.3.1. Podjela tirozin-kinaza

Tirozin-kinaze primarno se dijele na nereceptorske tirozin-kinaze (NRTK) i receptorske tirozin-kinaze (RTK). Nereceptorske tirozin kinaze potom možemo podijeliti na temelju njihove sličnosti u građi domena na obitelji SRC (engl. proto-oncogene c-Src), ABL (engl. Abelson murine leukemia), FAK (engl. focal adhesion kinase), JAK (engl. Janus kinase) i ostale (Slika 8) (Paul i Mukhopadhyay, 2004). Receptorske tirozin-kinaze su enzimski aktivni transmembranski receptori koji primanjem izvanstaničnih podražaja uzrokuju signalne kaskade, regulirajući na taj način gotovo sve važne biološke procese. Identificirano je sveukupno 58 receptorskih tirozin-kinaza u koje ubrajamo receptor epidermalnog faktora rasta (engl. Epidermal growth factor receptor, EGFR), receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. Vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), receptor faktora rasta porijeklom iz trombocita (engl. Platelet-derived growth factor receptor, PDGFR), receptor faktora rasta fibroblasta (engl. Fibroblast growth factor receptors, FGFR), inzulinski receptor (engl. Insulin receptor, IR) i mnoge druge (Slika 7) (Paul i Mukhopadhyay, 2004). Mutacije i izmijenjene funkcije kod ovih skupina kinaza, najčešći je uzrok pojave metaboličkih i autoimunih bolesti kao i raka (Zinkle i Mohammadi, 2018).



Slika 7. Prikazane su obitelji i članovi obitelji receptorskih tirozin-kinaza.

(preuzeto i prilagođeno iz H. Huang, Biomolecules **11** (2021) 660)



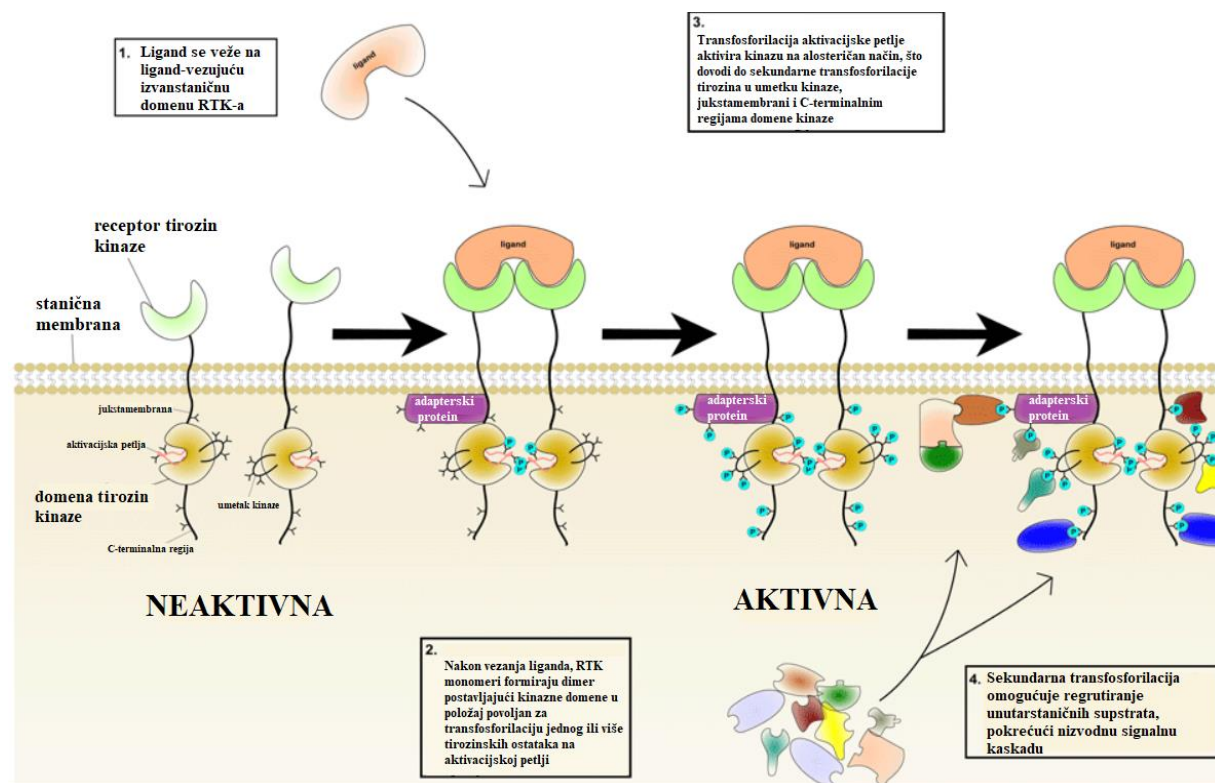
Slika 8. Prikazane su obitelji nereceptorskih tirozin-kinaza. NRTK filogram izveden je iz aminokiselinskih sekvenci kinaznih domena.

(preuzeto i prilagođeno iz E. Gocek i sur., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. **51** (2014) 125–137)

2.3.2. Djelovanje receptorskih tirozin-kinaza

Sve receptorske tirozin-kinaze (RTK) sadrže izvanstaničnu domenu tzv. receptor, jednu hidrofobnu transmembransku α -uzvojnicu i intracelularnu kinaznu domenu koja veže i fosforilira odgovarajuće supstrate. Izvanstanične domene međusobno se strukturno razlikuju te zbog toga različite receptorske tirozin-kinaze prepoznaju i vežu drukčije vrste liganada. Sve RTK-e (osim podobitelji inzulinskih receptora (IR) i njoj sličnih) su monomerne jedinice čiji proces dimerizacije ovisi o ligandu. Ligandi poput faktora rasta, citokina ili hormona, svojim vezivanjem uzrokuju dimerizaciju izvanstanične domene, usmjeravajući na taj način intracelularne kinazne domene u položaj stabilan i povoljan za uzajamnu fosforilaciju. Na taj način postignuta je enzimska aktivnost koja rezultira kaskadom reakcija gdje se ulazni podražaj prenosi putem signalnih puteva (Slika 9) (Zinkle i Mohammadi, 2018). Signalne molekule ostvaruju kontakt s receptorskim tirozin-kinazama putem proteinskih domena: SH2-domene (engl. Src homology 2) ili PTB-domene (engl. phosphotyrosine-binding) koje vežu peptide koji

u svom sastavu sadrže fosfotirozin (Cooper i Hausman, 2004). Različiti ligandi, na različite načine stupaju u interakciju s receptorima stvarajući posljedično dimere različite stabilnosti. Neki tvore kompleks ligand-receptor u omjeru 1:2, vezivanjem jedne molekule liganda na dvije molekule receptora (poput hormona rasta), dok drugi tvore kompleks u omjeru 2:2, odnosno vezivanjem dvije molekule liganda na dvije molekule receptora (poput vaskularnog endotelnog faktora rasta) (Paul i Mukhopadhyay, 2004). Stabilnost dimera posljedica je jačine interakcija ligand-receptor, receptor-receptor te ostalih protein-protein interakcija karakterističnih za određenu receptorsku tirozin-kinazu, kao i dostupnosti liganda koji sudjeluje u nastanku dimera. Manje stabilni RTK dimeri nisu u mogućnosti fosforilirati kinetički nepovoljna mjesta te stoga sveukupno fosforiliraju manje tirozina na mjestu regrutiranja. Suprotno tome, RTK dimeri velike stabilnosti aktiviraju tirozine i na kinetički nepovoljnim mjestima regrutiranja čime se postiže istovremena aktivacija mnogobrojnih nizvodnih puteva (Zinkle i Mohammadi, 2018). Članovi IR podbobotelji dimeri su po svojoj prirodi i stoga predstavljaju iznimku među ostalim receptorskim tirozin-kinazama (Zinkle i Mohammadi, 2018). Najčešće, po završetku prijenosa signala, lizosomski enzimi vrše degradaciju receptora tirozin-kinaza. Ipak, u nekim slučajevima, receptori se recikliraju i njihova aktivnost se obnavlja (Paul i Mukhopadhyay, 2004).



Slika 9. S lijeva na desno prikazano je vezivanje liganda što inducira RTK dimerizaciju, čime unutarstanične domene kinaze dolaze u odgovarajuću orijentaciju/blizinu za transfosforilaciju tirozina (prikazani kao Y simboli) u aktivacijskoj petlji, a time i do aktivacije kinaze. Ovo

zauzvrat pokreće sekundarne transfosforilacije (prikazano tirkizno) u kinaznom umetku, jukstamembrani i C-terminalnim repnim regijama, čime nastaju mjesta spajanja za regrutiranje različitih unutarstaničnih supstrata (prikazano u nizu oblika /boja dolje desno). Oblici tamnijih nijansi prikazuju vezane i aktivirane supstrate.

(preuzeto i prilagođeno iz A. Zinkle i M. Mohammadi, F1000Research 7 (2018) 872)

2.3.3. Djelovanje nereceptorskih tirozin-kinaza

Aktivnost nereceptorskih tirozin-kinaza (NRTK) nužna je za djelovanje receptora koji samostalno nisu kinazno aktivni. Slično receptorskim tirozin-kinazama, ovi su receptori građeni od izvanstanične domene za vezanje liganda, transmembranske α -uzvojnice te intracelularne domene koja je, u ovom slučaju, enzimski neaktivna. Vezivanjem liganda, dolazi do dimerizacije receptora s kojima unutarstanične proteinske tirozin-kinaze ostvaruju nekovalentnu interakciju. U idućem koraku, nereceptorske tirozin-kinaze aktiviraju se međusobnom fosforilacijom i vrše fosforilaciju receptora, stvarajući fosfotirozinska vezna mjesta za SH2-domene ili PTB-domene. Preko spomenutih domena, signalne molekule ostvaruju kontakt s receptorom i potiču kaskadu reakcija. Primjer ovakvog djelovanja su receptori za citokine združeni s JAK nereceptorskim tirozin-kinazama (Slika 12) (Cooper i Hausman, 2004).

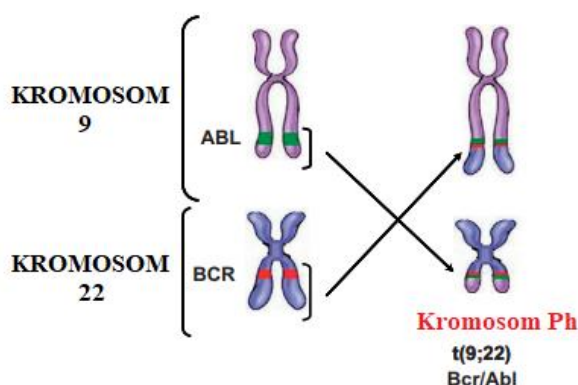
2.3.4. Signalizacija i rak

Ljudski organizam djeluje kao cjelina zahvaljujući usklađenoj i reguliranoj mreži djelovanja signalnih molekula koje prenose informacije među stanicama. Jedna vrsta signalnih molekula su proteinski faktori rasta koji kontroliraju procese rasta i diferencijaciju stanica. Primjer takvih faktora su NGF (engl. nerve growth factor, faktor rasta neurona) koji upravlja razvojem živčanih stanica, EGF (engl. epidermal growth factor, epidermalni faktor rasta) koji potiče proliferaciju stanica te PDGF (engl. platelet-derived growth factor, trombocitni faktor rasta) koji potiče proliferaciju fibroblasta i na taj način utječe na cijeljenje rana (Cooper i Hausman, 2004). Većina signalnih molekula, uključujući hormone, citokine i faktore rasta, prenose podražaj vezivanjem na stanične površinske receptore jer nemaju mogućnost prolaska kroz membranu stanice. Primjer takvih receptora su receptorske tirozin-kinaze koje sadrže receptore za većinu faktora rasta i vezivanjem istih potiču kaskadu reakcija čiji je konačni cilj prijenos početnog signala do jezgre ciljne stanice (Cooper i Hausman, 2004). Mnoge proteinske tirozin-kinaze predstavljaju ljudske onkogene proteine koji nastaju kao posljedica mutacija normalnih

staničnih gena (Engelman i Settleman, 2008). Budući da raznovrsne receptorske i nerekceptorske proteinske tirozin-kinaze sudjeluju u reakcijama stanične signalizacije, regulacije staničnog ciklusa te programirane stanične smrti, defekti ili mutacije istih tih kinaza dovode do poremećenih i dereguliranih kinaznih signalnih puteva koji su temelj karcinogeneze. Nastanak raka ne smatra se nužno posljedicom genetskih mutacija, već i posljedicom epigenetskih promjena koje naknadno dovode do negativnih promjena u staničnoj aktivnosti (Ardito i sur., 2017). Najčešći oblici karcinoma, u kojima je opažena abnormalna aktivnost tirozin-kinaza, su melanom, rak dojke, rak pluća te rak debelog crijeva. Budući da postoji opsežan broj signalnih puteva koji disregulacijom tirozinskih kinaza i ostalih signalnih molekula dovode do razvika bolesti i karcinoma, navedeni su samo neki od njih (Gocek i sur., 2014).

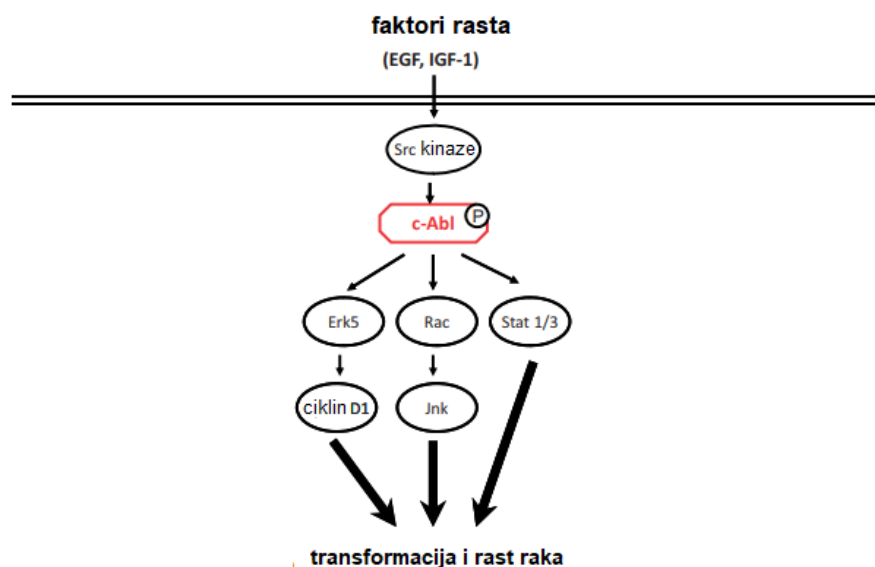
2.3.4.1. Bcr-Abl signalni put

U zdravim stanicama kinaza c-Abl sudjeluje u biološkim procesima pregradnje aktina, kontrole stanične adhezije i pokretljivosti te doprinosi staničnoj obrani od raznih patogena. Translokacija protoonkogen *abl* s 9. na 22. kromosom uzrok je nastanka onkogenog fuzijskog proteina Bcr/Abl, tipičnog za kroničnu mijeloičnu leukemiju, čija je kinazna aktivnost puno izraženija nego li kod zdravih stanica (Slika 10). Također, prekomjerna ekspresija kinaze c-Abl aktivira onkogene signalne puteve aktivacijom ERK5, Rac/Jnk i STAT 1/3 puteva uočenih u raznim tumorima poput raka dojke, raka debelog crijeva i raka pluća nemalih stanica (Slika 11) (Gocek i sur., 2014).



Slika 10. Prikazan je fuzijski kromosom Bcr/Abl. Kromosom Ph je skraćeni oblik kromosoma 22 nastao translokacijom dugog kraka kromosoma 9 u kromosom 22. Nakon takve translokacije, protoonkogen *abl* se prenosi iz segmenta q34 kromosoma 9 u segment q11 kromosoma 22 gdje se inače nalazi gen *bcr* te kao rezultat toga nastaje fuzijski gen *bcr/abl*. Produkt translacije nastalog fuzijskog gena *bcr/abl* je fuzijski protein Bcr/Abl koji ima povećanu aktivnost u usporedbi s normalnom kinazom Abl.

(preuzeto i prilagođeno iz E. Gocek i sur., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. **51** (2014) 125–137)



Slika 11. Prikazane su signalne kaskade c-Abl u stanicama raka. Fosforiliran uzvodnim tirozin-kinazama, kao što su Src kinaze, EGFR ili IGF-1 receptor, c-Abl aktivira onkogene signalne puteve aktivacijom ERK5, Rac/Jnk i STAT 1/3 puteva. Kratice: EGFR, receptor epidermalnog faktora rasta; IGF-1, inzulinu sličan faktor rasta 1; STAT 1/3, pretvarač signala i aktivator transkripcije 1/3; Rac, rho obitelj GTP-aza.

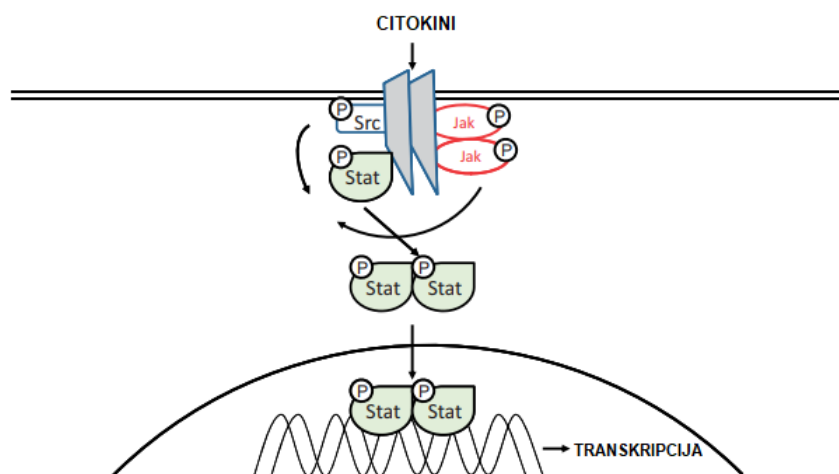
(preuzeto i prilagođeno iz E. Gocek i sur., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. **51** (2014) 125–137)

2.3.4.2. PI3-kinaza/Akt signalni put

Signali iz puta PI3-kinaza/Akt kontroliraju Bcl-2-porodicu proteina unutar koje većina članova stimulira aktivaciju kaspaza i programiranu staničnu smrt tj. apoptozu (Cooper i Hausman, 2004). Apoptoza je ovisna o faktorima rasta te je od velikog značaja za normalno funkcioniranje organizma jer se njome odstranjuju bolesne i oštećene nefunkcionalne stanice. Proteini Bcl-2 primanjem signala stanične smrti, otpuštaju citokrom c iz mitohondrija koji se veže na protein Apaf-1, stimulirajući nastanak kompleksa Apaf-1/kaspaza-9. U tom kompleksu, kaspaza-9 je aktivna te aktivacijom ostalih vrsta kaspaza dovodi do stanične smrti. Povećana aktivnost fosfatidil-inozitol (PI)-3-kinaze dovodi do prekomjerne fosforilacije inozitola na položaju 3' te pretvorbe PIP2 (fosfatidil-inozitol-4,5-bifosfat) u PIP3 (fosfatidil-inozitol-3,4,5-trifosfata). Povišena koncentracija PIP3 te aktivacija proteina Akt dovode do prekomjerne aktivnosti Bcl-2 koji sada ne otpušta citokrom c iz mitohondrija čime inhibira apoptozu u uvjetima koji normalno potiču staničnu smrt. To je jedan od ključnih uzročnika svih vrsta karcinoma u ljudi (Cooper i Hausman, 2004).

2.3.4.3. Jak/STAT signalni put

Temeljna funkcija obitelji Jak kinaza je fosforilacija i aktivacija transkripcijskih STAT faktora (Slika 12). Putem STAT faktora, Jak kinaze aktiviraju ekspresiju gena povezanu sa staničnim stresom, proliferacijom i diferencijacijom. Regulirana funkcija Jak kinaza neophodna je u procesu stvaranja krvnih stanica, upalnim procesima te održavanju imuniteta. Disregulacija Jak/STAT signalnog puta uočena je kod ljudi oboljelih od akutne limfoblastične leukemije, akutne mijeloične leukemije, reumatoidnog artritisa, psorijaze te mijeloproliferativnih bolesti. Posljedica je mutacija u Jak2 genima koji rezultiraju stvaranjem fuzijskih onkogenih proteina prekomjerne aktivnosti poput PCM1-Jak2 u M2 i M6 podtipovima akutne mijeloične leukemije. Također abnormalno djelovanje drugog člana Jak kinaza tzv. Tyk2 uočeno je u procesima onkogeneze i progresije tumora posebice raka dojke, raka prostate te raka vrata maternice (Gocek i sur., 2014).



Slika 12. Prikazan je Jak/ STAT signalni put. Vezanje liganda na citokinske receptore inducira njihovu dimerizaciju. Jak proteini vežu se na receptore preko svojih SH2 domena, podvrgavaju unakrsnoj fosforilaciji i nakon toga fosforiliraju STAT. STAT se odvajaju od svojih receptora i dimeriziraju putem svojih SH2 domena. Na kraju odlaze u jezrgu i aktiviraju transkripciju ciljnih gena. Kratice: Jak, porodica Janus kinaza; STAT, pretvarači signala i aktivatori transkripcije.

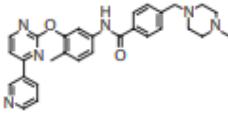
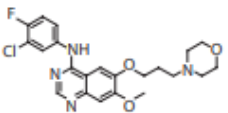
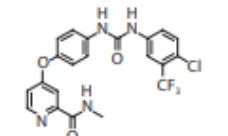
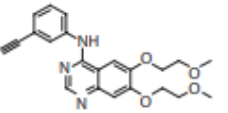
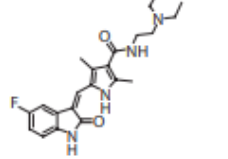
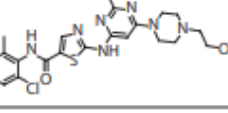
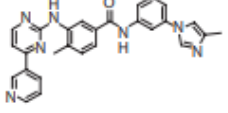
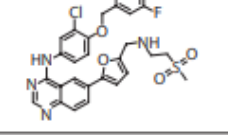
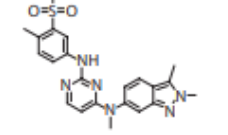
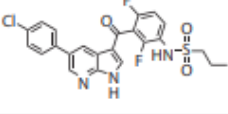
(preuzeto i prilagođeno iz E. Gocek i sur., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. **51** (2014) 125–137)

2.3.5. Inhibitori tirozin-kinaza

Signalne mreže djelovanja proteinskih kinaza strogo su regulirane što doprinosi normalnom funkcioniranju organizma. Deregulacije tih signalnih puteva izazvane mutacijama ili vanjskim čimbenicima mogu dovesti do nenormalnog ponašanja stanica što je osnova za razvoj većine bolesti, posebice karcinoma (Ardito i sur., 2017). Upravo zato, proteinske kinaze postale su predmet interesa farmaceutske industrije s ciljem razvoja lijekova protiv karcinoma (Tablica 2). Do sada je postignut veliki napredak u razvoju inhibitora mutiranih proteinskih kinaza abnormalnog djelovanja kod karcinoma i upalnih bolesti (Dar i Shokat, 2011). Čak njih 20, odobreno od FDA (engl. U.S. Food and Drug Administration, Američka Agencija za hranu i lijekove) pronašlo je svoje mjesto u kliničkoj primjeni kao lijek za razne bolesti poput reumatoidnog artritisa, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti te raznih vrsta tumora (Wang i sur., 2014). Iako je većina inhibitora dizajnirana tako da djeluju kao antagonisti čiji je primarni cilj inhibicija signalnog puta kinaze od interesa, neki se ponašaju kao agonisti potičući aktivnost ciljnih kinaza (Dar i Shokat, 2011). Time je omogućena manipulacija procesima signalizacije proteinskih kinaza te modulacija raznih bolesti kod kojih je zapažena patogena aktivnost proteinskih kinaza (Grant, 2008).

Tablica 2. Prikazana su imena, strukture, godine odobrenja te ciljne bolesti odobrenih nekih inhibitora proteinskih kinaza.

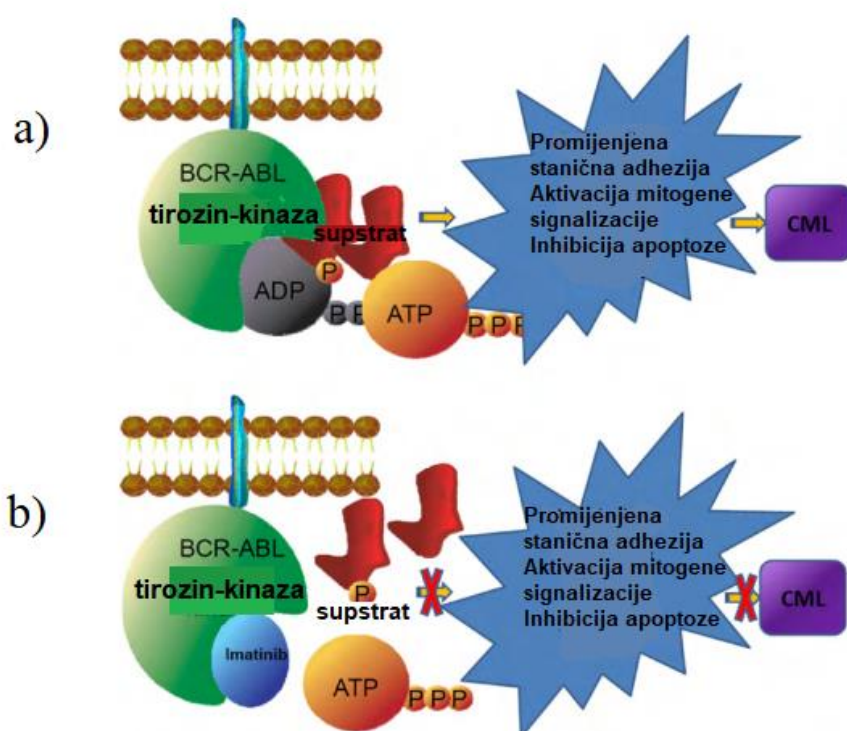
(preuzeto i prilagođeno iz A. C. Dar i K. M. Shokat, Annu. Rev. Biochem. **80** (2011) 769-795)

Lijek	Struktura	Godina odobrenja	Korištenje u liječenju
Imatinib		2001	Kronična mijeloična leukemija Stromalni tumori gastrointestinalnog sustava
Gefitinib		2003	Rak pluća nemalih stanica
Sorafenib		2005	Karcinom bubrežnih stanica Hepatocelularni karcinom
Erlotinib		2005	Rak gušterače
Sunitinib		2006	Karcinom bubrežnih stanica Imatinib-rezistentni stromalni tumori gastrointestinalnog sustava
Dasatinib		2006	Kronična mijeloična leukemija Akutna limfoblastična leukemija
Nilotinib		2007	Imatinib-rezistentna kronična mijeloična leukemija
Lapatinib		2007	HER2 + rak dojke
Pazopanib		2009	Napredni karcinom bubrežnih stanica
PLX4032		Pod regulatornom revizijom	BRAF mutirani metastatski melanom

Klinički razvoj inhibitora uglavnom je usmjeren prema mutiranim faktorima rasta ili receptorskim tirozin-kinazama jer je upravo mutacija tih čimbenika razlog tumorigeneze i angiogeneze. Svi otkriveni inhibitori sistematiziraju se ovisno o receptoru odnosno tirozin-kinazi na koju djeluju (Grant, 2008).

2.3.5.1. Bcr-Abl kinazni inhibitor

Onkogeni fuzijski protein Bcr-Abl, zbog pretjerane fosforilacije tirozinskih ostataka supstrata, uzrokuje prekomjerno umnožavanje mijeloidnih stanica te je zaslužan za oboljenje od kronične mijeloične leukemije. Gleevec, poznatiji kao Imatinib, prvi je odobren Bcr-Abl kinazni inhibitor koji se veže na ATP-vezujuće mjesto proteina Bcr-Abl, ometajući vezivanje i naknadnu fosforilaciju supstrata. Na taj način inhibirana je aktivnost mutiranog proteina Bcr-Abl. Zbog uočene rezistencije na Imatinib, dizajniran je lijek druge generacije tzv. Nilotinib koji pokazuje puno veći afinitet za vezivanje na ATP-vezujuće mjesto fuzijskog proteina. Na taj način učinkovitije inhibira nenormalno djelovanje proteina Bcr-Abl (Slika 13) (An i sur., 2010).

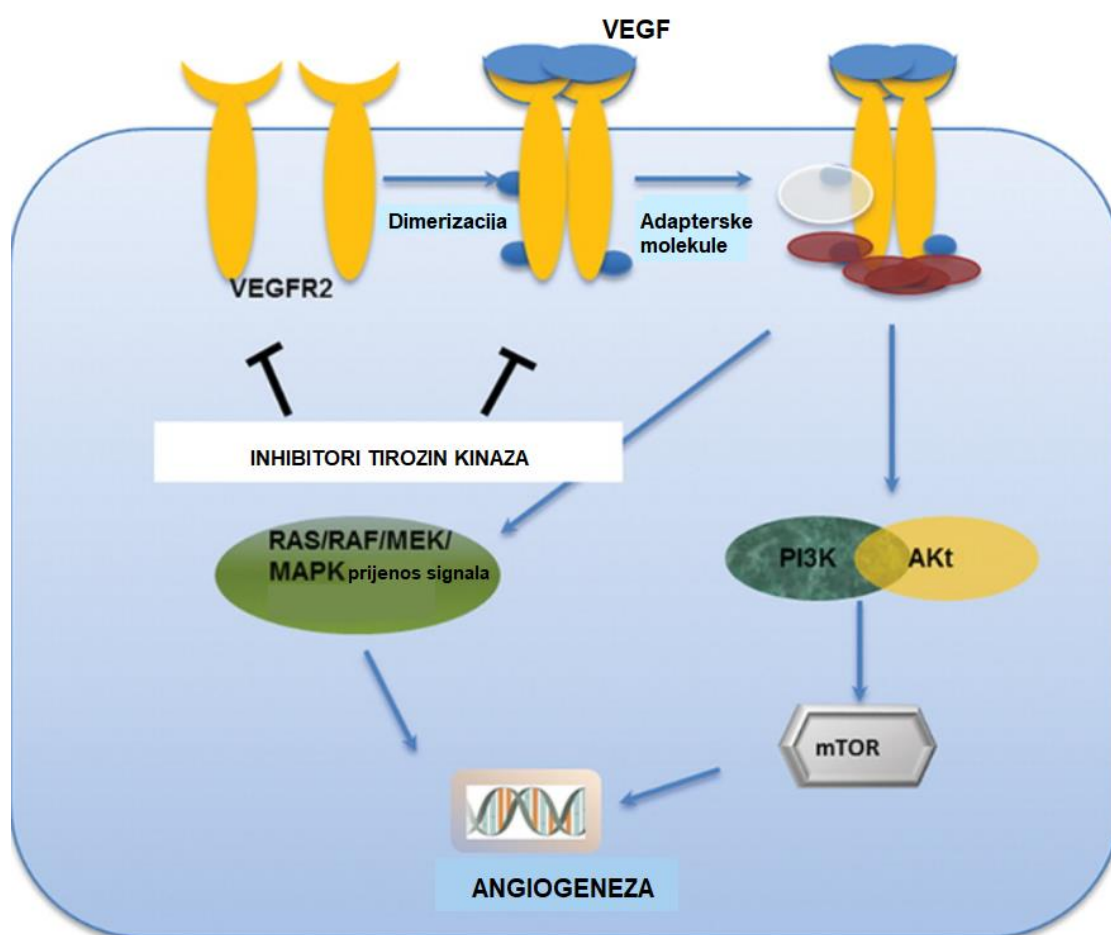


Slika 13. Shematski je prikazan mehanizam djelovanja Bcr-Abl tirozin kinaznog inhibitora Imatiniba. a) ATP zauzima mjesto u onkogenom proteinu Bcr-Abl. Fosforilacijom supstrata potaknuti su procesi staničnog mehanizma koji dovode do kronične mijeloične leukemije (CML). b) Imatinib zauzima ATP-vezujuće mjesto čime je spriječena fosforilacija supstrata i ometano daljnje provođenje signala.

(preuzeto i prilagođeno iz X. An i sur., Leukemia Research **34** (2010) 1255–1268)

2.3.5.2. VEGFR kinazni inhibitori

Mutirani vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) vezivanjem na receptor VEGFR (Slika 14) potiče kaskadu reakcija koje dovode do procesa angiogeneze. To je proces nastanka novih krvnih žila koje posljedično održavaju tumorske stanice na životu (Tirumani i sur., 2015). Sorafenib je prvi prihvaćen lijek protiv tumora koji vezivanjem na receptorsku tirozin-kinazu VEGFR, inhibira njezinu aktivnost te koči proces angiogeneze što je bitno za prekid rasta i razvoja tumorskih stanica. Radi se o multi-inhibitoru koji može izravno inhibirati umnažanje tumorskih stanica kočenjem RAS/RAF/MEK/MAPK signalnog puta ili angiogeneze djelovanjem na kinazu VEGFR (Jiao i sur., 2018). Velika prednost ovog lijeka je smanjena pojava rezistencije na isti kao posljedica genetske stabilnosti endotelних stanica (Tirumani i sur., 2015).

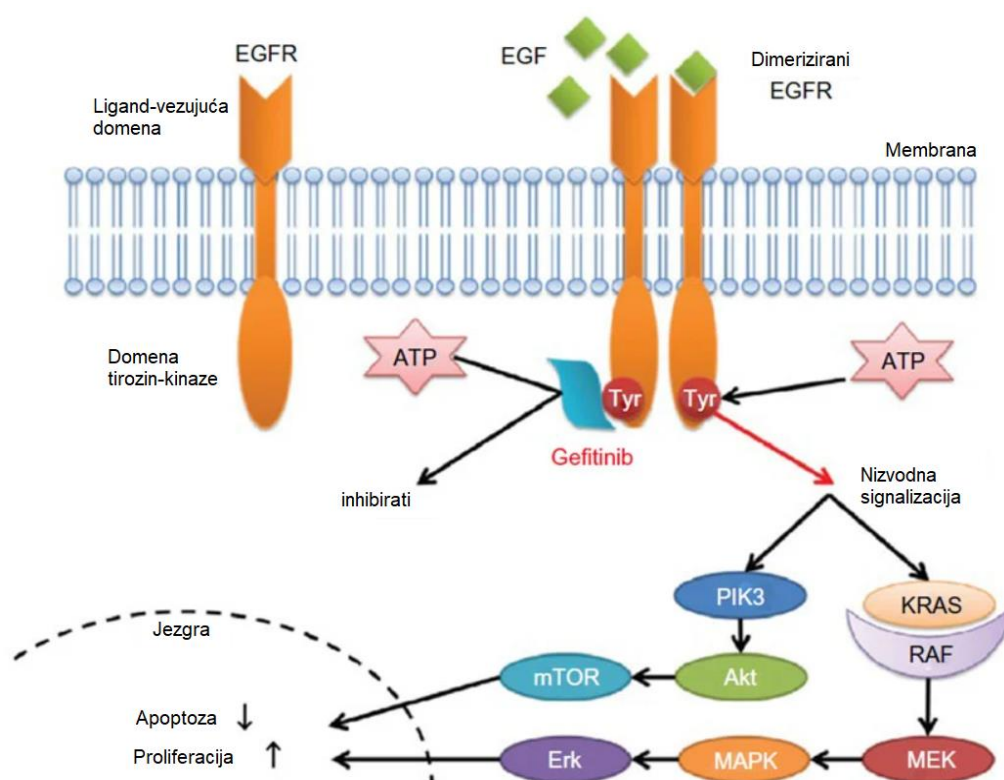


Slika 14. Shematski je prikazana inhibicija kinaze VEGFR2. Vezivanje mutiranog faktora VEGF na kinazu VEGFR2 dolazi do kaskade reakcija koje u konačnici dovode do angiogeneze. U prisutstvu inhibitora tirozin-kinaza blokira se RAS/RAF/MEK/MAPK signalni put koji onemogućuje proces angiogeneze.

(preuzeto i prilagođeno iz S. H. Tirumani i sur., RadioGraphics 35 (2015) 2)

2.3.5.3. EGFR kinazni inhibitori

Mutacija u ljudskom genu *EGFR*, uzrokovana delecijom egzona 19, potiče abnormalno djelovanje proteina EGFR-a. Budući da EGFR kao receptorska tirozin-kinaza sudjeluje u regulaciji preživljavanja i smrti epitelnih stanica te karcinoma podrijetlom iz epitelnih stanica, njegova prekomjerna aktivnost uočena je ponajprije u tumorskim epitelnim stanicama, a zatim i u karcinomu pluća nemalih stanica, raku dojke, raku mokraćnog mjehura, raku prostate te karcinomu skvamoznih stanica glave i vrata gdje potiče rast i uznapredovanje malignih stanica (Jiao i sur.,2018). Gefitinib i Erlotinib jedni su od inhibitora EGFR-a koji se kompetitivno vežu na unutarstanično ATP-vezujuće mjesto i time sprječavaju njegovu aktivaciju (Slika 15). Uz ta dva lijeka, otkriven je i Lapatinib koji koristi dvostruki mehanizam inhibiranja EGFR i HER2 signalnih puteva. Svi lijekovi u konačnici sprječavaju rast tumora, metastaze i angiogenezu. Međutim, većina pacijenata je nakon nekog vremena (oko 12-16 mjeseci) stekla rezistenciju na spomenute lijekove, što je potaklo farmaceutsku industriju na razvoj lijekova druge generacije poput Afatiniba, Dakomitiniba, Neratiniba i brojnih ostalih (Seebacher i sur., 2019).



Slika 15. Shematski je prikazan mehanizam djelovanja tirozin-kinaznog inhibitora Gefitiniba. On svojim vezanjem na ATP-aktivno mjesto blokira mutirani EGFR da fosforilira tirozinske ostatke čime je onemogućena nizvodna signalizacija i razvoj bolesti.

(preuzeto i prilagođeno iz Y. Yuan i sur., *OncoTargets and Therapy* 7 (2014) 841-852)

3. ZAKLJUČAK

Ispravna aktivnost proteinskih kinaza ključna je za normalno funkcioniranje ljudskog organizma jer fosforilacijom specifičnih serinskih, treoninskih ili tirozinskih ostataka, reguliraju djelovanje brojnih enzima u ljudskom organizmu. Najistaknutije su tirozin-kinaze koje tvore regulacijsku mrežu s različitim mehanizmima kontrole staničnog rasta, diferencijacije, migracije, apoptoze i metabolizma. Upravo zato, abnormalne aktivnosti ili prekomjerne ekspresije proteinskih tirozin-kinaza uzrokuju maligne transformacije stanica i pojavu karcinogeneze, kao i brojnih drugih bolesti. Stoga su brojni biomedicionari novijeg doba svoj fokus usmjerili ka istraživanju upravo ovih enzima. Zahvaljujući njima, do danas je otkriven i odobren veliki broj inhibitora tirozin-kinaza koji su pokazali povoljan učinak u liječenju brojnih bolesti, uglavnom karcinoma.

4. LITERATURA

An X., Tiwari A.K., Sun Y., Ding P.-R., Ashby C. R., Chen Z.-S. (2010), BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review, *Leukemia Research*, 34 (10), 1255-1268.

Ardito F., Giuliani M., Perrone D., Troiano G., Lo Muzio L. (2017), The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review), *International Journal of Molecular Medicine*, 40 (2), 271-280.

Berg J. M., Tymoczko J., Stryer L. (2013), *BIOKEMIJA*, 6.izdanje, Zagreb: Školska knjiga, str. 284-288, 437.

Cooper G. M., Hausman R. E. (2004), *STANICA-Molekularni pristup*, 3.izdanje, Zagreb: Medicinska naklada, str. 311-312, 541-583, 631-668.

Dar A. C., Shokat K. M. (2011), The Evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling, *Annual Review of Biochemistry*, 80 (1), 769-795.

Engelman J. A., Settleman J. (2008), Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy, *Current Opinion in Genetics & Development*, 18 (1), 73-79.

Esteban-Villarrubia J., Soto- Castillo J. J., Pozas J., San Román-Gil M., Orejana-Martín I., Torres-Jiménez J., ... Molina- Cerrillo J., (2020), Tyrosine Kinase Receptors in Oncology, *International Journal of Molecular Science*, 21 (22), 8529.

Fabbro D., Ruetz S., Buchdunger E., Cowan-Jacob S. W., Fendrich G., Liebetanz J., ... Manley P. W. (2002), Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs, *Pharmacology & Therapeutics*, 93 (2-3), 79-98.

Gocek E., Moulas A. N., Studzinski G. P. (2014), Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 51(3), 125-137.

Hanks S. K. (2003), Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective, *Genome Biology*, 4 (5), 111.

Hardie D. G. (2018), Keeping the home fires burning: AMP- activated protein kinase, *Journal of the royal society interface*.

Huang H. (2021), Proteolytic Cleavage of Receptor Tyrosine Kinases, *Biomolecules*, 11 (5), 660.

- Jiao Q., Bi L., Ren Y., Song S., Wang Q., Wang Y. (2018), Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance, *Molecular Cancer*, 17 (1).
- Manning G., Whyte D. B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. (2002), The protein kinase complement of the human genome, *Science*, 298 (5600), 1912-1934.
- Murray R. K., Bender D. A., Botham K. M., Kennelly P. J., Weil P. A. (2011), Harperova ilustrirana biokemija, 28. izdanje, Zagreb: Medicinska naklada, str. 80-83, 453, 623.
- Paul M. K., Mukhopadhyay A. K. (2004), Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer, *International Journal of Medical Sciences*, 1(2), 101-115.
- Schwartz P. A., Murray B. W. (2011), Protein kinase biochemistry and drug discovery, *Bioorganic Chemistry*, 39 (5-6), 192-210.
- Secko D. (2003), Protein phosphorylation: A global regulator of cellular activity, *Science Creative Quarterly*.
- Seebacher N.A., Stacy A.E., Porter G.M., Merlot A.M. (2019), Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38 (1).
- Tirumani S. H., Fairchild A., Krajewski K. M., Nishino M., Howard S. A., Baheti A. D., ...Ramaiya N. H. (2015), Anti-VEGF Molecular Targeted Therapies in Common Solid Malignancies: Comprehensive Update for Radiologists, *RadioGraphics*, Vol. 35, No.2.
- Wang Q., Zorn J.A., Kuriyan J. (2014), Chapter Two - A Structural Atlas of Kinases Inhibited by Clinically Approved Drugs, *Methods in Enzymology*, Vol. 548, 23-67.
- Yeung W., Ruan Z., Kannan N. (2020), Emerging roles of the α C- β 4 loop in protein kinase structure, function, evolution, and disease, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 72 (6), 1189-1202.
- Yuan Y., Li X., Chen J., Dong C., Weng S., Huang J. (2014), Critical appraisal of the role of gefitinib in the management of locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer, *OncoTargets and Therapy*, 7, 841-852.
- Zinkle A., Mohammadi M. (2018), A threshold model for receptor tyrosine kinase signaling specificity and cell fate determination, *F1000Research*, 7, 872.

Mrežne stranice

LabXchange. An Integrated Introduction to Chemistry and Biology. A primer on cell signaling. Protein Phosphorylation. <https://www.labxchange.org/library/pathway/lx-pathway:22ec5d53-af84-4dc4-9481-71c80990aadf/items/lx-pb:22ec5d53-af84-4dc4-9481-71c80990aadf.html:d10a4783> (pristupljeno: rujan, 2022).

ThermoFisher Scientific. Protein Biology Resource Library. Pierce Protein Methods. Phosphorylation.

<https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/phosphorylation.html> (pristupljeno: rujan, 2022).