UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav biologie

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Modulace a indukce buněčné smrti inhibitory serinových a kaspasových proteas u leukemických buněčných linií

Mgr. Ivo Frydrych

Olomouc 2009

Tato práce vznikla za významné podpory výzkumného projektu MSM 6198959216.

Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci vypracoval samostatně a použil v ní pouze zdroje, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci 28. 8. 2009

Rád bych na tomto místě poděkoval svému školiteli Doc. RNDr. Petru Mlejnkovi Ph.D. za kvalitní odborné vedení, cenné rady a připomínky a poskytnutí výborných pracovních podmínek pro vytvoření této práce. Můj dík patří také všem kolegům z Ústavu biologie LF UP za jejich ochotu a vytvoření přátelského prostředí, jmenovitě pak děkuji laborantce Lence Šmídové-Střelcové za pomoc s některými experimenty. Děkuji také své rodině a přítelkyni Báře za jejich nezměrnou trpělivost, toleranci a všestrannou podporu.

Obsah

1 Obecný úvod 1

2 Kategorizace buněčné smrti 3

2.1 Apoptóza: morfologické znaky a význam 4

2.2 Nekróza a její morfologie 7

2.3 Autofagie: morfologie a fyziologické projevy 7

3 Mechanismus apoptózy a její regulace 10

3.1 Biochemické znaky apoptózy, aktivace endonukleas 10

3.2 Kaspasy – objev, struktura a vlastnosti 12

3.2.1 Rozdělení kaspas a mechanismy jejich aktivace 13

3.2.2 Kaspasové substráty 19

3.2.3 Fyziologické inhibitory kaspas 20

3.2.4 Syntetické inhibitory kaspas 22

3.3 Biochemické dráhy aktivace kaspas v průběhu apoptózy 23

3.3.1 Aktivace apoptózy mitochondriální drahou 24

3.3.2 Aktivace apoptózy prostřednictvím receptorů smrti 25

3.3.3 Aktivace apoptózy prostřednictvím cytotoxických granulí 28

3.4 Mitochondrie a buněčná smrt 30

3.4.1 Aktivátory buněčné smrti 31

3.4.2 Bcl-2 proteiny 32

3.5 Nekaspasové proteasy v procesu buněčné smrti 35

3.5.1 Kathepsíny 36

3.5.2 Kalpainy 39

3.5.3 Serinové proteasy 41

3.5.3.1 Granzymy 44

3.5.3.2 Fyziologické inhibitory serinových proteas 45

3.5.3.3 Syntetické inhibitory serinových proteas 46

4 Mechanismy neapoptotických forem buněčné smrti 48
4.1 Nekróza 48
4.2 Autofagie 50

5 Cíle dizertační práce 52

6 Metodické postupy 53

7 Komentář k předloženému souboru prací 57
7.1 Modulace buněčné smrti inhibitory serinových proteas u leukemických buněčných linií 57
7.2 Možné mechanismy cytotoxického účinku TPCK a TLCK u leukemických buněčných linií 85

8 Shrnutí 101

9 Summary 103

10 Seznam použité literatury 105

11 Seznam zkratek 117

12 Seznam publikací a abstraktů 120
12.1 Práce související s dizertační prací 120
12.2 Ostatní publikace a abstrakta 121

1 Obecný úvod

Vývoj a zachování života mnohobuněčných organizmů vyžadují přísnou rovnováhu mezi buněčným dělením, které dává vzniknout novým buňkám a buněčnou smrtí, paralelně probíhajícím procesem, který zabezpečuje odstraňování buněk nadbytečných, nepotřebných nebo potenciálně nebezpečných. Ačkoliv bylo studium buněčné smrti v dřívější době ve srovnání s jinými fyziologickými pochody málo populární, dnes již tento proces patří mezi hlavní témata řešená vědci, farmakology i kliniky.

Vůbec první koncept buněčné smrti navrhl již v polovině 19. století patolog Virchow, který přirovnával buněčnou smrt z dnešního pohledu k nekróze, degenerativnímu procesu probíhajícímu v uhynulých živočiších. Virchow tak nepřímo pasoval buněčnou smrt do role vědecky neatraktivního tématu upozaděného za studium zajímavějších oborů zabývajících se růstem či diferenciací buněk. Téma fyziologické buněčné smrti získalo konkrétní obrysy zásluhou W. Fleminga, který popsal morfologické změny u odumírajících buněk, odpovídající z dnešního pohledu apoptóze a pojmenoval tento jev „chromatolysis“. Později byla chromatolysis chápána jako protiklad k buněčnému dělení, tedy jako mechanismus zajišťující tkáňovou homeostázi. V 50. letech minulého století bylo zásluhou embryologů potvrzeno, že chromatolysis je také součástí normálního embryonálního vývoje obratlovců. Tato významná zjištění ukazující na zapojení buněčné smrti do embryogeneze a normálního ontogenetického vývoje podnítila zájem o hlubší studium tohoto fenoménu. Dostupnost vhodných experimentálních nástrojů však byla v té době natolik omezená, že se dlouho nedařilo mrtvou buňku charakterizovat, ať už z hlediska morfologie či nalezením nějakých biochemických rozdílů.

První kdo prolomil tuto bariéru byl na počátku 70. let australský patolog J.F. Kerr se svými spolupracovníky, kteří dokázali na základě morfologických kriterií jednoznačně odlišit živou a mrtvou buňku a zároveň navrhli rozlišení dvou různých typů buněčné smrti: i) fyziologické buněčné smrti – apoptózy (původně schrinkage necrosis = scvrklá nekróza) a ii) nefyziologické buněčné smrti – nekrózy (Kerr, 1971; Kerr et al., 1972). Studium apoptózy se na počátku omezovalo pouze na morfologické charakteristiky, až v průběhu 80. let byla rozpoznána první biochemická vlastnost -

aktivace nukleas, která byla několik následujících let považovaná za nejvýznamnější biochemickou událost apoptózy. Kromě aktivace endonukleas bylo prokázáno, že apoptóza je na rozdíl od nekrózy procesem aktivním, vyžadujícím buněčnou energii a zároveň se předpokládalo, že se na jejím průběhu podílí samotná buňka aktivací specifických biochemických drah. Jistě tedy nepřekvapí alternativní označení apoptózy synonymem „programovaná buněčná smrt“, hojně užívaným během následujících let, které zároveň umocňovalo její odlišení od nekrózy, smrti neprogramované (pasivní). Zásadní význam pro objasnění mechanismů apoptózy měl na počátku 90. let objev specifických proteas, jejichž aktivace se ukázala být pro průběh apoptózy klíčová.

2 Kategorizace buněčné smrti

V literatuře nacházíme řadu konceptů vymezujících různé typy buněčné smrti na základě různých kriterií. Je zřejmé, že vzhledem ke spletitosti a vzájemnému překryvu či využití podobných signálních drah v rámci různých typů buněčné smrti, je mnohdy velmi složité a problematické přesně stanovit jakou smrtí vlastně buňka umírá. Díky tomu jsou modely navržené různými autory někdy v jistých ohledech odlišné nebo dokonce i protichůdné. Velmi často se ve vědecké literatuře setkáváme s rozdělením buněčné smrti na základě morfologie. Toto kriterium s sebou ovšem přináší někdy nejednoznačné závěry v typizaci buněčné smrti. Podle morfologie můžeme fyziologickou či patologickou buněčnou smrt rozdělit do nejméně tří typů: apoptóza, autofagie a nekróza (Clarke, 1990; Kroemer et al., 2005; Galluzzi et al., 2007).

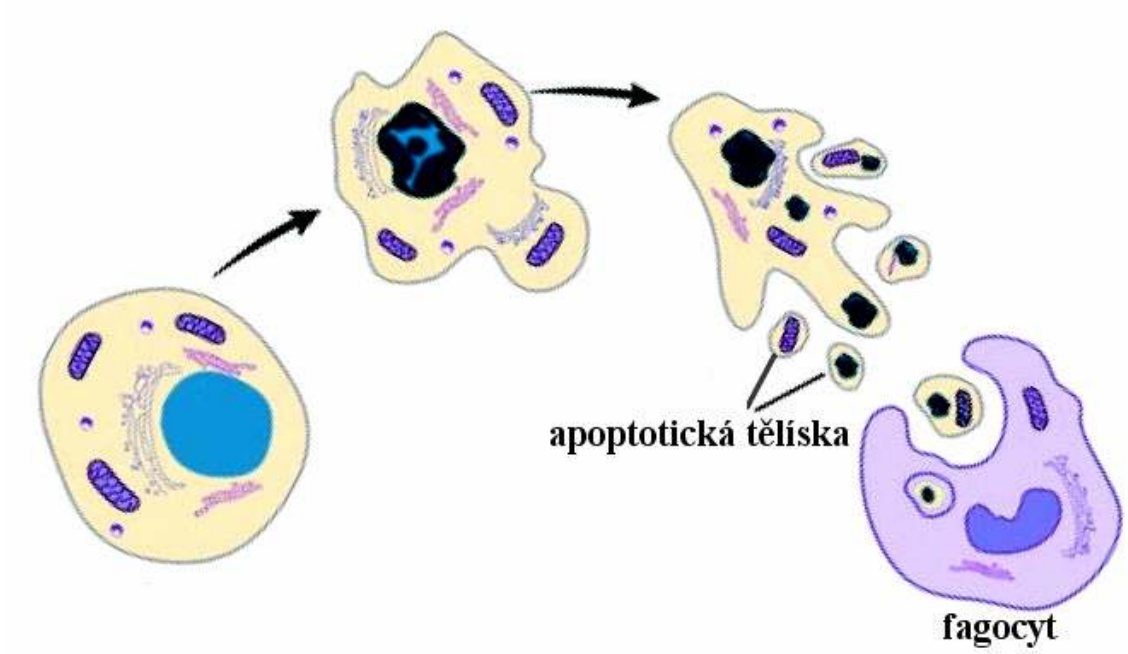
Mnohem vhodnější a zároveň průkaznější se ukázala být klasifikace buněčné smrti podle aktivace specifických biochemických drah, které mohou poskytnout jednoznačnější závěry při určování typu buněčné smrti. Téměř dvě desetiletí po objevu specifických proteas zodpovědných za proteolytický rozklad buňky v procesu apoptózy již dokážeme nahlédnout hlouběji pod povrch také jiných typů buněčné smrti, než je apoptóza. Dynamický vývoj v oblasti buněčné smrti pomohl odhalit také některé specifické biochemické dráhy aktivované v průběhu nekrózy či autofagie, tedy u typů buněčné smrti, jejichž definice byla ještě donedávna postavena výhradně na morfologických charakteristikách.

V následujících podkapitolách bude uvedena obecná charakteristika tří typů buněčné smrti, které lze považovat za nejprobádanější. Kromě těchto byla v literatuře popsána celá řada dalších jako je rohovatění (Candi et al., 2005; Lippens et al., 2005), Walleriánova degenerace (Raff et al., 2002) a některé varianty apoptózy, které se uvádějí samostatně (anoikis nebo mitotická smrt; Gilmore, 2005; Castedo et al., 2004).

2.1 Apoptóza: morfologické znaky a význam

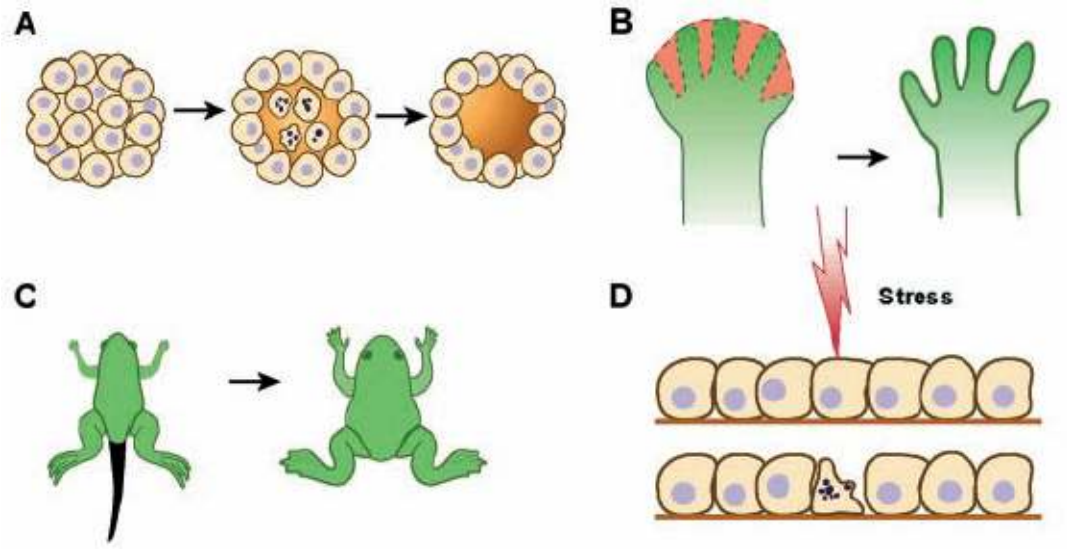
Apoptóza byla poprvé popsána na počátku 70. let J.F. Kerrem na základě morfologických charakteristik. Tato definice byla během následujících let upřesňována a ač je ve vědecké literatuře stále používána, z dnešního pohledu vyhovuje již pouze částečně.

Buňky které umírají apoptózou se vyznačují zmenšováním objemu a zakulacováním tvaru. K typickým a nejprůkaznějším projevům apoptotické morfologie patří kondenzace chromatinu (pyknóza) a fragmentace jádra (karyorhexe). Na plazmatické membráně se objevují charakteristické puchýřky (blebbing), zatímco její integrita zůstává, *in vivo*, zachována. Buněčné organely nevykazují výrazné morfologické změny. V pokročilém stádiu apoptózy dochází k fragmentaci již mrtvé buňky na tzv. apoptotická tělíska (budding), která jsou ohraničena membránou a obsahují cytoplazmu, intaktní organely nebo části kondenzovaného chromatinu (Obr. 1). Apoptotická tělíska jsou následně fagocyticky pohlcena makrofágy, parenchymatickými buňkami nebo buňkami nádorovými a degradována za účasti lysozomů pohlcující buňky. Samotný průběh apoptózy ani následné odstraňování mrtvých buněk nejsou *in vivo* doprovázeny zánětlivou reakcí v okolní tkáni, jako je tomu u nekrózy. Apoptóza na rozdíl od nekrózy postihuje jednotlivé buňky nebo pouze malé shluky buněk. Nutno podotknout, že v případě apoptózy indukované *in vitro* v buněčných kulturách, v nichž obvykle nelze očekávat fagocytózu, dochází v její pozdní fázi k permeabilizaci cytoplazmatické membrány a tento jev bývá označován termínem „sekundární nekróza“.



Obr. 1. Morfologické znaky apoptózy. V průběhu apoptózy buňky zmenšují svůj objem a na membráně se vytvářejí puchýřky, zatímco její integrita zůstává zachována. V jádře dochází ke kondenzaci chromatinu a následné fragmentaci. Celý proces končí rozpadem buňky na apoptotická tělíska, která jsou pohlcena fagocyty nebo okolními buňkami (obrázek převzat od Saikumar et al., 1999; vlastní úprava).

Apoptóza je vysoce koordinovaný, geneticky regulovaný a energeticky závislý proces, který v sobě zahrnuje komplexní síť událostí, jež propojují aktivační signál s konečnou smrtí buňky. Apoptóza je nedílnou součástí embryonálního a ontogenetického vývoje organismu, hraje klíčovou úlohu při morfogenezi a je nepostradatelná pro zachování tkáňové homeostáze (Obr. 2). Zároveň působí jako obranný mechanismus při imunitních reakcích a je zodpovědná za odstraňování mutovaných, infikovaných, nefunkčních nebo jinak poškozených buněk představujících ohrožení integrity organismu. Při vývoji imunitního systému podléhají apoptóze nefunkční T-lymfocyty, jejichž receptory nejsou schopny rozpoznat hlavní histokompatibilní komplex (MHC) glykoproteinů okolních buněk nesoucích antigen a rovněž také autoreaktivní T-buňky namířené proti vlastnímu organismu (Jameson et al., 1995). Apoptóza provází atrofii prostaty, prsní žlázy nebo jiných endokrinně regulovaných tkání a podílí se také na vývoji mozkové tkáně odstraňováním neuronů, které nevytvořily funkční synapse.



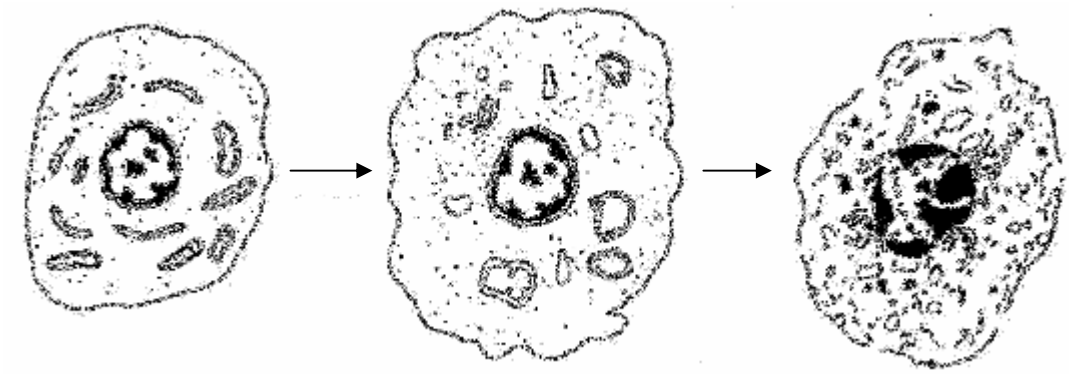
Obr. 2. Typické příklady fyziologického projevu apoptózy. V průběhu embryogeneze se apoptóza podílí např. na útváření tělních dutin plodu (A). Apoptóza je klíčová pro morfogenezi - zodpovídá např. za formování prstů rukou a nohou specifickým odstraňováním meziprstní tkáně (B) nebo doprovází přeměnu pulce v žábu eliminací nadbytečných struktur (C). Apoptóza je nepostradatelná pro zachování tkáňové homeostáze eliminací neopravitelně poškozených buněk, které jsou nahrazeny buňkami novými (obrázek převzat od Saikumar et al., 1999).

Ačkoliv existuje široké spektrum fyziologických či patologických podnětů, které mohou spustit apoptotický program, reagují různé buněčné typy na působení daného stimulu různě. Ionizující záření nebo chemoterapeutika jsou využívána k indukci apoptózy v protinádorové terapii. Hormony, jako například kortikosteroidy, zase indukují apoptózu u jiných buněčných typů jako jsou thymocyty, zatímco buňky dalších tkání terapii odolávají nebo mohou být dokonce stimulovány. V některých případech podmiňuje charakter či intenzita signálu osud buňky ve smyslu smrti apoptotické či nekrotické. Nízká intenzita signálu, jako je tepelný šok, záření (UV nebo γ), hypoxie nebo cytotoxické protinádorové léčivo, může buňku směrovat k apoptóze, zatímco vyšší dávka stejného podnětu vyvolá nekrózu.

Narušená regulace apoptózy se projevuje u celé řady patologických stavů. Nadměrné odumírání buněk přispívá k vývoji neurodegenerativních a neurovývojových onemocnění, jako jsou Alzheimerova, Parkinsonova nebo Huntingtonova nemoc. Podobně se vyskytuje zvýšená míra apoptózy u některých nemocí hematologického původu (neutropenie). Naopak nedostatečné odumírání buněk je důležitým faktorem při vzniku a vývoji nádorových či autoimunitních onemocnění (Kerr et al., 1994; Fadeel et al., 1999).

2.2 Nekróza a její morfologie

Podle původní definice opírající se o morfologická kritéria byla nekróza charakterizována jako typ buněčné smrti, jež nenese morfologické znaky apoptózy nebo autofagie (Kerr et al., 1972). Na rozdíl od apoptózy byla chápána jako proces nahodilý a nekontrolovaný, jež je provázen bobtnáním organel i celé buňky v důledku porušení iontové homeostáze. Tyto změny vedou již v časném stádiu nekrózy k porušení integrity cytoplazmatické membrány a následnému vyplavení buněčného obsahu, což vyvolá v okolních tkáních zánětlivou reakci. Při nekróze je významně narušen energetický metabolismus (biosyntéza ATP) a buněčné struktury i organely se rozpadají. Samotný proces buněčné smrti je vhodnější označovat termínem onkóza, neboť nekróza definuje spíše morfologický obraz již mrtvé buňky. Lze tedy říci, že onkóza vyúsťuje v nekrózu. Protože jsou v literatuře oba pojmy zaměňovány, doporučuje se z historického hlediska používat termín nekróza namísto správného onkóza (Kroemer et al., 2005).

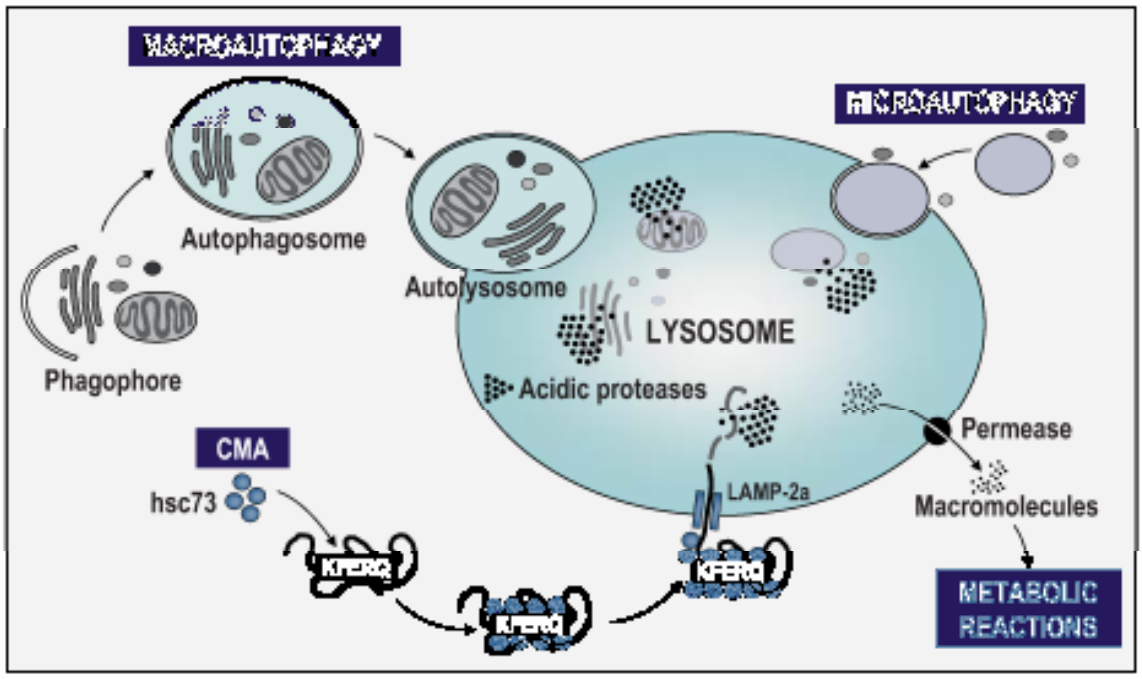


Obr. 3. Morfologické znaky nekrózy. V průběhu nekrózy buňka zvětšuje svůj objem a bobtnají také jednotlivé organely. Tyto události vedou již v časném stádiu procesu k permeabilizaci plazmatické membrány, vylití buněčného obsahu do okolí a navození zánětlivé reakce.

2.3 Autofagie: morfologie a fyziologické projevy

Termín autofagie v sobě zahrnuje několik různých mechanismů. Jedná se o makroautofagii, mikroautofagii a chaperony zprostředkovanou autofagii (Cuervo, 2004; Obr. 4). Nejlépe prostudována je makroautofagie, která se označuje zkráceným výrazem autofagie a je jediným mechanismem, jež má přímou souvislost s buněčnou smrtí. Při autofagii dochází k obalení částí cytoplazmy nebo celých organel dvojitou

membránou za vzniku tzv. autofagosomů. Auofagosomy mohou dále fúzovat s lysozomy, což vede ke vzniku jednomembránových struktur, tzv. autolysozomů (Obr. 4). Působením kyselých lysozomálních hydrolas následně dochází k natrávení a rozložení pohlceného materiálu. Na rozdíl od apoptózy není autofagie provázena kondenzací chromatinu a autofagická morfologie nemá žádnou nebo pouze minimální spojitost s fagocytózou (Baehrecke, 2005).



Obr. 4. Základní typy autofagie a jejich mechanismy. Proces makroautofagie (zkráceně označované autofagie) je jediným z popsaných mechanismů autofagie s přímým vztahem k apoptóze. Zahrnuje tvorbu autofagosomu, jež může fúzovat s lysozomem za vzniku autolysozomu a účinkem lysozomálních proteas pak dochází k rozložení pohlceného materiálu. CMA = chaperony zprostředkovaná autofagie; hsc73 = protein tepelného šoku velikosti 73 kDa; LAMP-2a = protein typu 2a asociovaný s lysozomální membránou (obrázek převzat od Vicencio et al., 2008).

Autofagie je evolučně zakonzervovaný proces, který plní významnou úlohu v řadě buněčných procesů (Levine a Klionsky, 2004). Fyziologicky je aktivována především za podmínek hladovění, kdy zajišťuje buňkám složky nezbytné pro průběh životně důležitých metabolických reakcí. Autofagie slouží dále k odstraňování nebo recyklaci opotřebovaných či poškozených organel (Mizushima, 2007). Nejnovější studie ukazují také možný podíl autofagie na enukleaci v průběhu terminální diferenciace erytrocytů (Sandoval et al., 2008).

Fyziologická úloha autofagie v souvislosti s procesem buněčné smrti prozatím zůstává předmětem sporu. Bylo však popsáno již několik konkrétních případů, které účast autofagie jasně potvrzují. Autofagie je zodpovědná za vývoj slinné žlázy u octomilky (Berry and Baehrecke, 2007) a provází také vývoj samčího genitálu (Dyche, 1979). U savců se autofagie podílí například na regresi žlutého tělíska nebo involuci prsní žlázy (Paavola, 1978). Autofagie je také spojována s vývojem a průběhem některých onemocnění, jako je rakovina nebo neurodegenerativní onemocnění, kde ovšem její úloha nebyla dosud zcela objasněna (Shintani a Klionsky, 2004; Alva et al., 2004).

3 Mechanismus apoptózy a její regulace

3.1 Biochemické znaky apoptózy, aktivace endonukleas

Jak již bylo zmíněno, výzkum apoptózy se na počátku omezoval pouze na morfologické charakteristiky. Vůbec první biochemická vlastnost apoptózy byla popsána na počátku 80. let. Wyllie a jeho kolegové zjistili, že během kondenzace chromatinu dochází k aktivaci endonukleas, které specificky štěpí jadernou DNA, což lze snadno dokumentovat pomocí standardní agarosové elektroforézy, po jejímž průběhu vzniká na gelu charakteristický „žebřík“ (Wyllie, 1980). Jednotlivé fragmenty velikostně odpovídají nukleosomu (180 bp) a jeho násobkům. Více než desetiletí byla fragmentace DNA na úroveň nukleosomů zásadním a také jediným biochemickým projevem apoptotické buněčné smrti a dále se soudilo, že k tomuto jevu dochází velmi časně po indukci apoptózy. Konkrétní DNasu zodpovědnou za nukleosomální fragmentaci DNA se však na molekulární úrovni dlouho nedařilo charakterizovat, neboť savčí buňky obsahují celou řadu endonukleas, jež se mohou účastnit apoptózy (Eastman a Barry, 1992). Prvotní studie omezující se převážně na thymocyty a buňky lymfatického původu naznačovaly, že klíčovou úlohu má zřejmě Ca^{2+}/Mg^{2+} závislá endonukleasa nelysozomálního původu, jejíž aktivace je podmíněna zvýšením intracelulární koncentrace vápenatých iontů (Cohen a Duke, 1984; McConkey et al., 1989). Na počátku 90. let se podařilo z apoptotických jader potkaních thymocytů izolovat aktivní nukleasu, jejíž funkční a antigenní vlastnosti byly téměř totožné s DNasou I (Peitsch et al., 1993). Bylo však zřejmé, že aktivitou jediné konkrétní endonukleasy nelze vysvětlit všechny případy apoptózy indukované u různých buněčných typů bez ohledu na jejich diferenciační stav či charakter apoptotického podnětu. Další endonukleasou popsanou v souvislosti s nukleosomální fragmentací DNA byla DNasa γ, jejíž enzymatické vlastnosti jsou velmi blízké DNase I (Shiokawa a Tanuma, 1998; Yakovlev et al., 1999). Vysoké aktivity lze naměřit při neutrálním pH a v přítomnosti Ca^{2+}/Mg^{2+}. Barry a Eastman dospěli k názoru, že zvýšená koncentrace Ca^{2+} nemusí být pro nukleosomální fragmentaci DNA klíčová. Podařilo se jim identifikovat novou nukleasu – DNasu II a ukázali, že rozhodujícím faktorem pro její aktivaci je snížení intracelulárního pH v průběhu apoptózy pod hodnotu 6,5 (Barry a Eastman, 1993; Barry et al., 1993). Za těchto pH senzitivních podmínek a v přítomnosti iontů Ca^{2+}/Mg^{2+} byla v jiném buněčném systému naměřena DNasová

aktivita také v případě endonukleasy DNAS1L2 (Shiokawa a Tanuma, 2001). DNAS1L2 je vůbec první savčí DNasou, jejíž aktivita je podmíněna kyselým pH a zároveň přítomností dvojmocných iontů.

Kromě výše uvedeného byly na počátku 90. let publikovány jiné práce, které ukázaly, že průběh apoptózy nemusí být podmíněn aktivací endonukleas nebo je na nich dokonce zcela nezávislý (Thompson, 1991; Oberhammer et al., 1991). Překvapující bylo také zjištění, že apoptotická buňka nemusí mít DNA fragmentovanou až na úroveň nukleosomů. V některých buněčných systémech jsou totiž výsledkem štěpení DNA v průběhu apoptózy pouze vysokomolekulární fragmenty o velikosti 50–300 kb (Oberhammer et al., 1993). Bylo tedy zřejmé, že degradace DNA je složitější proces, který zahrnuje aktivitu několika nukleas. Jedním z prvních kandidátů zodpovědných za vznik vysokomolekulárních fragmentů byla topoisomerasa II, brzy se ovšem ukázalo, že její role není klíčová (Beere et al., 1995; Beere et al., 1996).

Ať už jsou výsledkem štěpení DNA vysokomolekulární či nukleosomální fragmenty, oba projevy jsou považovány za charakteristický znak apoptotické buněčné smrti. Dlužno dodat, že nukleosomální fragmentace DNA se oproti původním předpokladům ukázala být pozdní událostí apoptotického procesu (Oberhammer et al., 1993).

Navzdory intenzivnímu výzkumu nukleas se již na konci 80. let začalo uvažovat o možné aktivaci proteas v procesu apoptózy. Prvními kandidáty byly serinové proteasy, avšak zásadní význam pro pochopení mechanismů apoptózy měl na počátku 90. let objev specifických cysteinových proteas, jejichž aktivace se ukázala být pro proces apoptózy rozhodující. Tím byla pozvolna překonána, do té doby klíčová, úloha nukleas.

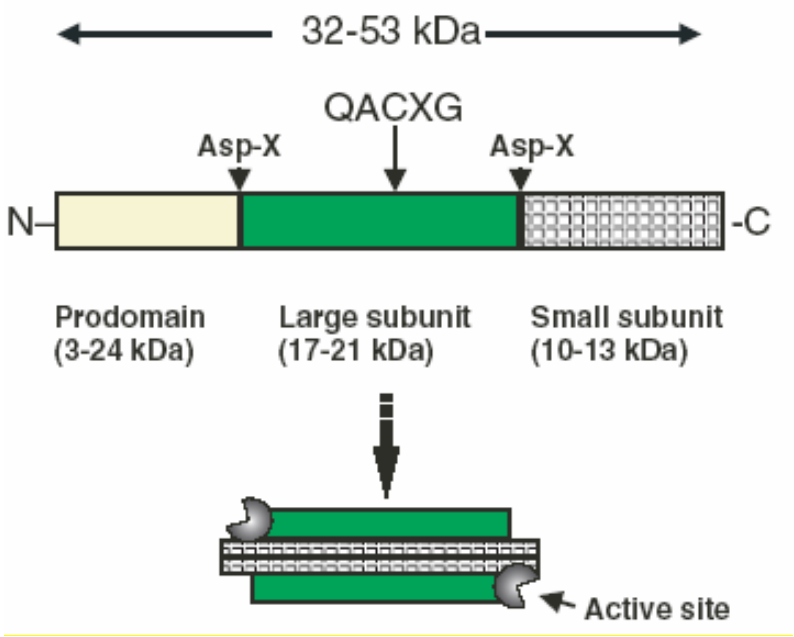
Kromě fragmentace DNA patří k typickým biochemickým znakům apoptózy také externalizace fosfatidylserinu. Fosfatidylserin je jedním z mnoha fosfolipidů cytoplazmatické membrány. Za fyziologických podmínek je distribuován asymetricky na vnitřní straně lipidové dvojvrstvy (Op den Kamp, 1979). Během apoptózy dochází k redistribuci fosfatidylserinu na vnější stranu cytoplazmatické membrány, čímž dává apoptotická buňka signál okolním makrofágům k následné fagocytóze a tím brání šíření zánětlivé reakce (Fadok et al., 1992; Savill a Fadok, 2000). Nedávné studie ukázaly,

že také další proteiny, jako např. Annexin I a kalretikulin, jsou během apoptózy exponovány na buněčném povrchu a mohou se tak aktivně podílet na odstraňování mrtvých buněk (Arur et al., 2003; Gardai et al., 2005).

3.2 Kaspasy – objev, struktura a vlastnosti

Objevu kaspas (caspases = cysteinyl aspartate proteinases) předcházely genetické studie u háďátka (*Caenorhabditis elegans*), které vedly k identifikaci genů zodpovědných za programovanou buněčnou smrt definovaného počtu buněk v průběhu ontogeneze tohoto modelového organismu. Tyto geny byly pojmenovány jako tzv. „geny smrti“ a nejvýznamnějším z nich se ukázal být gen *ced-3* (Ellis a Horvitz, 1986). V roce 1993 byl *ced-3* gen klonován a dílem náhody se podařilo nalézt podobnost jeho proteinového produktu s proteasou ICE (interleukin-1*β*-converting enzyme), studovanou ve stejné době jinou nezávislou skupinou (Thornberry et al., 1992; Yuan et al., 1993). Ukázalo se, že tato proteasa, dnes známá jako kaspasa-1, je zodpovědná za maturaci cytokinu IL-1*β* (interleukin-1*β*) a objev její homologie s genem *ced-3* předznamenal odhalení široké rodiny ICE příbuzných proteas. Tyto savčí proteasy byly pojmenovány „kaspasy“ a brzy se ukázalo, že jejich aktivace je klíčová pro ireverzibilní destrukci buněk v průběhu apoptózy (Alnemri et al., 1996). Význam genetických studií u *C. elegans* dokládá ocenění britských vědců Horvitze, Brennera a Sultona v roce 2002 Nobelovou cenou.

Kaspasy zahrnují skupinu strukturně příbuzných proteas s vyhraněnou substrátovou specifitou. Tyto evolučně zakonzervované cysteinové proteasy vynikají mezi jinými svou ojedinělou schopností specificky štěpit cílové peptidické sekvence substrátů za zbytkem kyseliny asparagové. V jejich aktivním místě lze nalézt konzervativní pentapeptid QAC**X**G (**X** = R, Q nebo G; Cohen, 1997). Kaspasy se vyskytují v cytoplazmě buněk ve formě neaktivních jednořetězcových proenzymů o velikosti 30–50 kDa. Jejich struktura zahrnuje N-koncovou prodoménu a malou (~10 kDa) a velkou (~20 kDa) podjednotku (Obr. 5). K aktivaci kaspas obvykle vede proteolytické štěpení na malou a velkou podjednotku, následně dochází k dimerizaci a výsledný aktivní enzym pak tvoří heterotetramer složený ze dvou větších a dvou menších podjednotek (Thornberry a Lazebnik, 1998; Obr. 5).

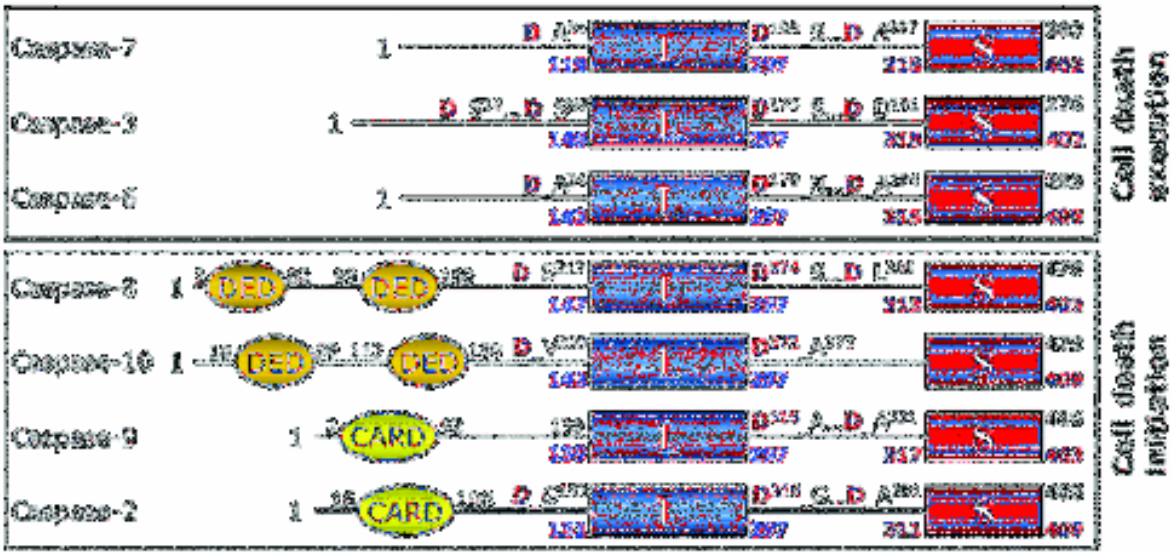


Obr. 5. Obecná struktura zymogenové a aktivní formy kaspas. Všechny popsané kaspasy vykazují typickou strukturu zymogenu, tvořenou třemi doménami: N-koncovou prodoménou a malou a velkou podjednotkou. Aktivní forma enzymu vzniká proteolytickým štěpením zymogenu ve specifických místech za vzniku malé a velké podjednotky a současného odštěpení prodomény. Nové uspořádání podjednotek a jejich dimerizace dává vzniknout aktivní formě kaspasy, která má podobu heterotetrameru se dvěma aktivními centry (obrázek převzat od Cain, 2003).

3.2.1 Rozdělení kaspas a mechanismy jejich aktivace

Dodnes bylo u člověka popsáno celkem 12 různých kaspas. Zatímco některé z nich jsou spojovány s procesem apoptózy, jiné se podílí na regulaci dalších fyziologických procesů jako je maturace cytokinů, terminální diferenciace nebo proliferace (Thornberry a Lazebnik, 1998; Garrido a Kroemer, 2004). Dominantní zastoupení mají ovšem jednoznačně kaspasy apoptotické (kaspasa-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10 a -12), další tři se účastní zanětlivých reakcí (kaspasa-1, -4 a -5) a specifické postavení zaujímá kaspasa-14, která řídí terminální diferenciaci keratinocytů (Lippens et al., 2000). Funkce kaspas a rovněž mechanismus jejich aktivace úzce souvisí s jejich strukturou. Rozdíly jsou patrné především v sekvenci a délce N-koncové oblasti polypeptidového řetězce, podle níž rozlišujeme kaspasy s dlouhou prodoménou nebo krátkou prodoménou. První skupina zahrnuje apoptotické kaspasy-2, -8, -9, -10 a -12 a kaspasy účastnící se zánětu, zbytek kaspas nese krátkou prodoménu. Apoptotické kaspasy s krátkou prodoménou se označují jako výkonné, zatímco dlouhá prodoména je typická pro kaspasy iniciační (Obr. 6). V rámci dlouhé prodomény můžeme nalézt

různé strukturní motivy. Pro kaspasy-2 a -9 je charakteristická tzv. CARD (caspase activation and recruitment domain) doména, další možností jsou tzv. DED (death effector domain) domény uspořádané tandemově ve dvojici, které se vyskytují v rámci prodomén u kaspasy-8 a -10 (Obr. 6). CARD a DED domény umožňují kaspasám interagovat s jinými regulačními proteiny prostřednictvím protein-proteinových interakcí, což obvykle vede k jejich aktivaci.

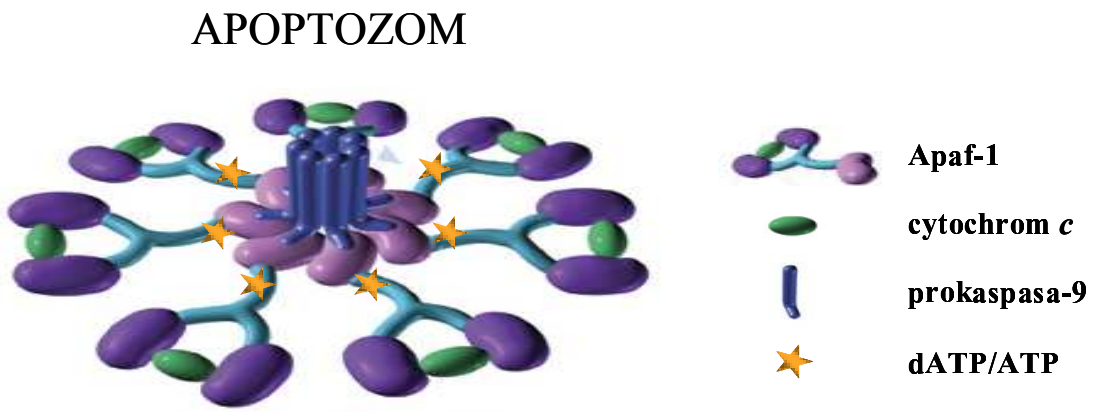


Obr. 6. Doménové uspořádání apoptotických kaspasových proteas. Z funkčního hlediska lze apoptotické kaspasy rozdělit na iniciační a výkonné. Výkonné kaspasy mají na N-konci lokalizovanou krátkou prodoménu, zatímco iniciační kaspasy charakterizuje dlouhá prodoména. Strukturní motiv dlouhé prodomény zahrnuje CARD doménu (kaspasa-2 a -9) nebo dvě tandemově uspořádané DED domény (kaspasa-8 a -10; obrázek převzat od Fuentes-Prior a Salvesen, 2004; vlastní úprava).

Kromě funkčního hlediska lze kaspasy dále členit podle preferované sekvence aminokyselin u cílového substrátu. Do první podskupiny patří kaspasy-1, -4, -5 a -14, které preferují tetrapeptid WEHD, druhá podskupina zahrnuje kaspasy-2, -3 a -7, jejichž cílovou sekvenci aminokyselin tvoří motiv DEXD a konečně do třetí podskupiny jsou řazeny kaspasy-6, -8, -9 a -10 upřednostňující sekvenci (L/V)EXD.

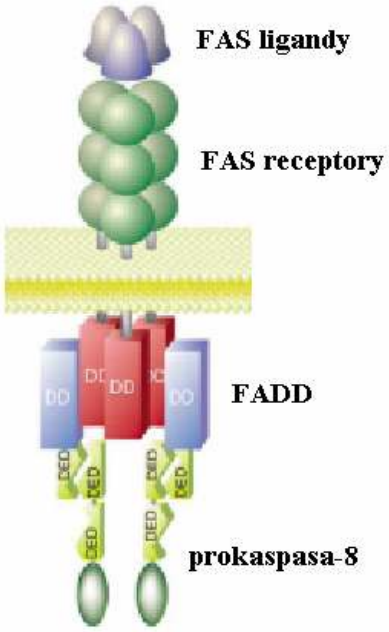
Mechanismus aktivace kaspasy-9 patří k nejlépe prostudovaným. Vytvoření aktivačního komplexu předchází uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií do cytoplazmy. Cytochrom *c* se v přítomnosti dATP nebo ATP váže k molekule Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) a tím indukuje její oligomerizaci (Liu et al., 1996; Li et al., 1997). Následkem oligomerizace prodělá molekula Apaf-1 takovou konformační

změnu, která zpřístupní N-koncovou oblast a umožní interakci její CARD domény s CARD doménou prokaspasy-9. Výsledkem těchto událostí je tzv. apoptozom, multimerní komplex tvořený sedmi molekulami prokaspasy-9 a stejným počtem molekul Apaf-1 a cytochromu *c* (Obr. 7). Apoptozom nakonec zprostředkuje proteolytickou aktivaci kaspasy-9. Tento model byl však již překonán, neboť další výzkumy ukázaly, že na rozdíl od jiných kaspas má proteolytické štěpení prokaspasy-9 pouze minimální vliv na katalytickou aktivitu enzymu. Rodriguez a Lazebnik prokázali, že pro aktivaci prokaspasy-9 je rozhodující asociace s Apaf-1 a komplex Apaf-1/kaspasa-9 tedy působí jako holoenzym (Rodriguez a Lazebnik, 1999). K podobným závěrům dospěla také jiná skupina, která ukázala, že mutovaná forma prokaspasy-9, neschopná proteolytické aktivace, může štěpit prokaspasu-3/-7 v přítomnosti Apaf-1 a cytochromu *c* (Stennicke et al., 1999). Aktivace kaspasy-9 v rámci multimerního komplexu prostřednictvím asociace s adaptorovými molekulami se podařila prokázat také rekonstrukcí *in vitro* (Liu et al., 1996). Podíl dATP/ATP na aktivaci kaspasy-9 lze považovat za první přesvědčivé vysvětlení, jak proces apoptózy závisí na buněčné energii. Tím byl přímo potvrzen původní koncept popisující apoptózu jako aktivní, energeticky závislý proces.



Obr. 7. Aktivace prokaspasy-9. K aktivaci prokaspasy-9 dochází po vytvoření multimerního komplexu zvaného apoptozom. Jeho vzniku předchází uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií do cytozolu. V přítomnosti ATP (dATP) se cytochrom *c* váže k molekule Apaf-1, což vyvolá její oligomerizaci, která je klíčová pro asociaci s prokaspasou-9 prostřednictvím CARD domén. Výsledný apoptozom má podobu heptameru (obrázek převzat od Sigma-Aldrich, vlastní úprava).

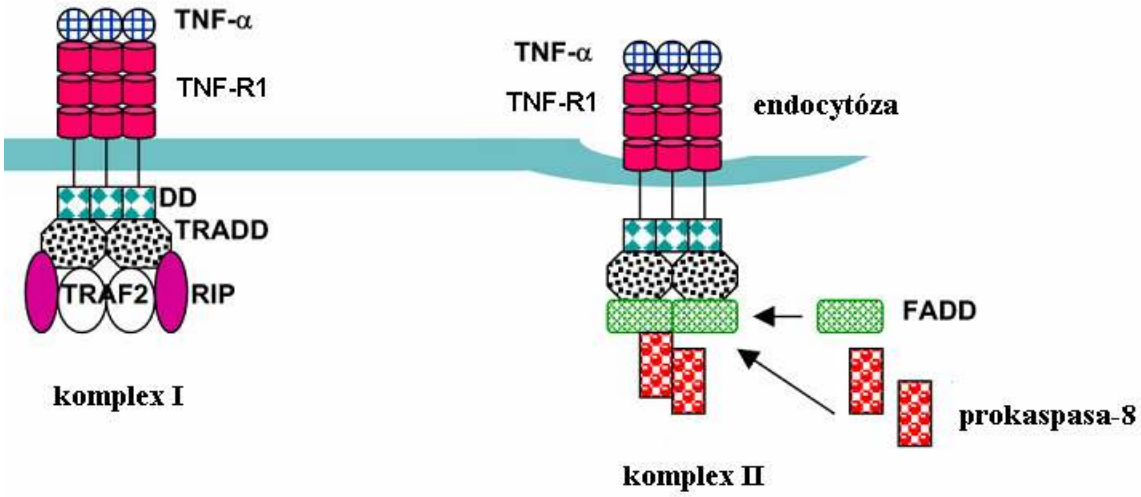
K aktivaci kaspasy-8 dochází prostřednictvím aktivačního komplexu, v jehož rámci sehrávají klíčovou úlohu adaptorové proteiny obsahující dva typy domén. Zatímco DD (death domain) doména umožňuje jejich interakci s receptory smrti, DED (death effector domain) doména zprostředkovává asociaci s prokaspasou-8. Tyto události vedou ke vzniku multimerního komplexu známého jako DISC (death-inducing signaling komplex), jehož hlavní funkcí je aktivace prokaspasy-8 (Boldin et al., 1995). Složení komplexu DISC se liší v závislosti na typu aktivovaného receptoru. Proměnlivou složkou je typ adaptorové molekuly. Aktivované receptory Fas a TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) využívají stejný typ adaptorové molekuly, tzv. FADD (Fas-associated death domain; Chinnaiyan et al., 1995; Bodmer et al., 2000; Obr. 8).



Obr. 8. Aktivace prokaspasy-8 prostřednictvím Fas receptoru. Fas receptory interagují prostřednictvím svých intracelulárních DD domén s DD doménami FADD adaptoru. Přítomnost DED domén umožňuje interakci FADD s prokaspasou-8. Vzniklý komplex zprostředkovává aktivaci prokaspasy-8. Obdobný mechanismus zahrnující adaptor FADD platí také pro aktivaci prokaspasy-8 po stimulaci receptoru TRAIL (obrázek převzat od Danial a Korsmeyer, 2004; vlastní úprava).

V případě stimulace TNF-R1 (tumor necrosis factor receptor) receptoru je signální dráha směřující k aktivaci kaspasy-8 poněkud složitější. Nejprve bylo popsáno, že následkem aktivace TNF-R1 nedochází v přítomnosti FADD a prokaspasy-8 k vytvoření komplexu DISC (Harper et al., 2003). Bylo tedy zřejmé,

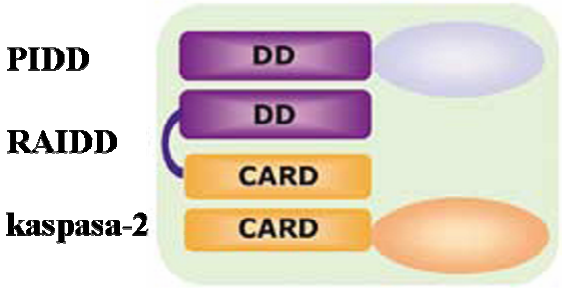
že systém vyžaduje další adaptorové molekuly, což se potvrdilo modelem dvou následných signálních komplexů (Micheau a Tschopp, 2003). Aktivovaný receptor TNF-R1 v první fázi vyvazuje adaptory TRADD (TNF receptor-associated death domain), RIP1 (receptor interacting protein-1) a TRAF2 (TNF receptor-associated factor-2) za vzniku komplexu I. Během následné endocytózy receptoru způsobují modifikace molekul RIP1 a TRAF2 jejich uvolnění z komplexu I. Prostřednictvím DD domény interaguje TRADD s FADD adaptorem, který vyvazuje prokaspasu-8 a tím tvoří komplex II (Obr. 9). Asociace prokaspasy-8 s FADD adaptorem je rozhodující pro její oligomerizaci a aktivaci (Micheau a Tschopp, 2003).



Obr. 9 Aktivace prokaspasy-8 prostřednictvím TNF-R1 receptoru. Aktivovaný receptor TNF-R1 vyvazuje adaptory TRADD, TRAF2 a RIP za vzniku komplexu I. Endocytóza receptorového komplexu I vede v další fázi k odloučení proteinů TRAF2 a RIP. Vznik komplexu II je podmíněn následnou asociací TRADD s adaptorem FADD a prokaspasou-8, což vede k její aktivaci (podle Gupta et al., 2006; vlastní úprava).

Kaspasa-10 je strukturně blízká kaspase-8 a může být aktivována po stimulaci Fas nebo TRAIL receptoru prostřednictvím FADD adaptoru (Wang et al., 2001). Navzdory této aktivační analogii není jasné, zda může kaspasa-10 funkčně zastoupit kaspasu-8. Vzhledem k odlišné substrátové specifitě obou kaspas je možné, že kaspasa-10 plní v buňce poněkud jiné funkce než kaspasa-8 (Sprick et al., 2002; Thornberry et al., 2000).

Kaspasa-2 je v pořadí druhou popsanou savčí kaspasou a zároveň první kaspasou apoptotickou. Struktura kaspasy-2 zahrnuje CARD doménu typickou pro iniciační kaspasy, avšak její biochemická funkce není spojována pouze s procesem apoptózy, ale zřejmě také s odpovědí buňky na různorodé stresové podněty (Lassus et al., 2002). Podobně, jako v případě ostatních iniciačních kaspas, je rovněž aktivace kaspasy-2 podmíněna tvorbou vysokomolekulárního komplexu. Kaspasa-2 je schopna interagovat s celou řadou regulačních proteinů a popsáno tak bylo hned několik různých aktivačních komplexů. Nejlépe popsaným je tzv. PIDDosom, jehož analýza odhalila přítomnost dvou klíčových adaptorových molekul RAIDD a PIDD (Tinel a Tschopp, 2004; Obr. 10). RAIDD (receptor-interacting protein (RIP)-associated ICH-1/CED-3 homologous protein) adaptor nese na N-konci CARD doménu umožňující interakci s kaspasou-2, zatímco DD doména na C-konci zprostředkovává jeho interakci s dalším adaptorem PIDD (p53 induced protein with a DD). Tvorba PIDDosomu byla potvrzena také v *in vitro* podmínkách současnou inkubací všech tří složek při 37 °C (Tinel a Tschopp, 2004).



Obr. 10. Aktivace prokaspasy-2. Jeden z možných mechanismů aktivace prokaspasy-2 zahrnuje tvorbu tzv. PIDDosomu, který je tvořen adaptory PIDD a RAIDD (převzato od Bao a Shi, 2007; vlastní úprava).

Kaspasy-3, -6 a -7 nesou na N-konci krátkou prodoménu a jsou označovány jako výkonné. K aktivaci zymogenů výkonných kaspas dochází jejich přímou proteolýzou kaspasami iniciačními nebo mohou být do aktivace zapojeny jiné proteasy. Dobře popsána je aktivace kaspasy-3 granzymem B (serinová proteasa). Dalšími možnými mediátory jsou kalpainy či kathepsíny, jak bude podrobněji popsáno v rámci kapitoly 3.5.

3.2.2 Kaspasové substráty

Pokud uvážíme, že aktivace kaspas je minimálně dvoukrokový proces, v němž iniciační kaspasy (kaspasa-8, -9 a -10) aktivují zymogeny kaspas výkonných (kaspasa-3, -6 a -7), pak lze za nejpřirozenější substráty kaspas jednoduše považovat samotné kaspasy (Salvesen a Dixit, 1997). V rámci iniciačních kaspas je nejvýznačnějším fyziologickým substrátem kaspasy-8 protein Bid, jehož aktivní forma tBid iniciuje mitochondriální apoptotickou dráhu (Li et al., 1998). Bid protein byl popsán *in vivo* také jako substrát pro aktivní kaspasu-2 (Guo et al., 2002). Tato je mezi ostatními vyjímečná tím, že je schopna procesovat sama sebe, nikoliv však proenzymy ostatních kaspas (Ahmad et al., 1997). Cílem iniciačních kaspas mohou být také některé strukturní proteiny. Například protein golgin-160, který dohlíží na integritu goldiho aparátu, podléhá během apoptózy proteolýze zprostředkované kaspasou-2 a rovněž αII-spektrin je popsaným substrátem této iniciační kaspasy (Mancini et al., 2000; Rotter et al., 2004). Strukturní proteiny plektin a vimetin byly v souvislosti s apoptózou popsány jako fyziologické substráty kaspasy-8, resp. -9 (Stegh et al., 2000; Nakanishi et al., 2001).

Dodnes bylo popsáno více než 500 různorodých buněčných proteinů, které jsou v průběhu apoptózy podrobeny proteolytickému štěpení kaspasami a další nové jsou neustále objevovány (Fischer et al., 2003). Ve většině případů vystupují jako substráty výkonných kaspas a obecně je můžeme rozdělit do několika funkčních skupin, jak uvádí Tab.1. Předpokládá se, že proteolýza specifických proteinů kaspasami se manifestuje typickou apoptotickou morfologií (Nicholson a Thornberry, 1997; Salvesen a Dixit, 1997).

Tab. 1. Hlavní skupiny fyziologických substrátů výkonných kaspas

Cytoskeletální a strukturní proteiny	**Fragmentace a reparace DNA**
Foldrin Aktin Laminy Gelsolin	PARP-1 (poly(ADP-ribosa)polymerasa-1) ICAD (inhibitor of caspase activated DNase) DNA-PK (DNA-dependent protein kinase)
Buněčný cyklus a replikace	**Přenos signálu**
Topoisomerasa-1 p21 Cyklin E Rb (retinoblastomový protein)	Protein kinasy Cδ, ε a θ FAK (focal adhesion kinase) PAK2 (p21 activated kinase) PP2A (protein phosphatase 2A)

Výkonné kaspasy projevují svou aktivitu štěpením cílových substrátů na diskrétní fragmenty, což vede u některých proteinů k jejich inaktivaci, zatímco v případě jiných může jít o efekt aktivační. V jistých případech dochází k ativaci/inaktivaci nepřímo. Takto se například podílí kaspasy na fragmentaci DNA. Na konci 90. let byla objevena nová specifická DNasa CAD (caspase-activated DNase), která štěpí vysokomolekulární fragmenty DNA na úroveň nukleosomů a jejíž aktivace je podmíněna aktivitou kaspasy-3. CAD tvoří za fyziologických podmínek neaktivní komplex se svým inhibitorem ICAD (inhibitor of CAD; Sakahira et al., 1998). Kaspasa-3 štěpí ICAD, což vede k rozpadu komplexu a aktivaci CAD (Enari et al., 1998; Sakahira et al., 1998).

Jak již bylo uvedeno, zcela vyjímečnou vlastností kaspas je schopnost rozpoznat zbytek kyseliny asparagové v rámci peptidické sekvence cílových substrátů a právě v tomto místě je podrobit štěpení. Této skutečnosti bylo na konci 90. let využito k syntéze umělých kaspasových substrátů na bázi krátkých oligopeptidů (obvykle tetrapeptid) obsahujících zbytek kyseliny asparagové a vázajících funkční skupinu, kterou může být fluorofor (např. AMC = 7-amino-4-methylkumarin) či chromofor (pNA = p-nitroanilid; Thornberry et al., 1997; Talanian et al., 1997). S využitím kombinatorických postupů se podařilo nalézt optimální sekvence pro všechny známé kaspasy. Syntetické kaspasové substráty slouží především k měření aktivity jednotlivých kaspas *in vitro* v buněčných lyzátech. Detekce se provádí měřením fluorescence (AMC) či absorbance (pNA) funkční skupiny odštěpené z oligopeptidu příslušnou aktivní kaspasou.

3.2.3 Fyziologické inhibitory kaspas

K zajištění normálního vývoje a přežití organismu je třeba kaspasy, jakožto klíčové apoptotické proteasy, podrobit přísné regulaci, k níž dochází na buněčné úrovni komplexním způsobem prostřednictvím aktivátorů a inhibitorů. Co se týče účinku kaspasových inhibitorů, existují v zásadě dva způsoby regulace: i) inhibice aktivace (procesingu) kaspas nebo ii) inhibice již aktivovaných kaspas.

Fyziologické inhibitory kaspas byly primárně identifikovány u virů a bakulovirů na základě jejich schopnosti potlačit apoptózu v infikovaných hostitelských buňkách.

Vůbec prvním popsaným kaspasovým inhibitorem byl CrmA (cytokine response modifier A), produkt viru kravských neštovic (Ray et al., 1992). Bylo zjištěno, že CrmA působí jako inhibitor kaspasy-1 a další testy prokázaly jeho účinnost také vůči kaspase-8 a -10 (Strasser et al., 2000). Přestože CrmA inhibuje kaspasy, patří vzhledem ke své struktuře a mechanismu působení do rodiny serpinů (fyziologické inhibitory serinových proteas). Mezi další známé fyziologické kaspasové inhibitory patří bakulovirové produkty p35 a p49. Oba proteiny projevují vlastnosti všeobecných kaspasových inhibitorů s podobným spektrem účinků (Zhou et al, 1998; Jabbour et al., 2002).

Rozhodující význam pro regulaci aktivovaných kaspas má bezesporu evolučně konzervovaná rodina IAPs (inhibitors of apoptosis) proteinů. Jejich inhibiční účinek spočívá v přímé interakci s aktivovanými kaspasami, a to jak iniciačními, tak výkonnými. Společnou vlastností všech IAP je přítomnost jedné až tří BIR (baculoviral IAP repeat) domén, které jsou klíčové pro jejich interakci s kaspasami. U savců bylo doposud popsáno osm zástupců této rodiny: XIAP, c-IAP1, c-IAP2, NAIP, survivin, apollon, ML-IAP a ILP-2 (Verhagen et al., 2001). Nejlépe prostudovaným a také nejúčinějším IAP proteinem je XIAP (X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein), který je přímým inhibitorem kaspasy-3, -7 a -9 (Holcik et al., 2001). Anti-apoptotický účinek IAPs je neutralizován některými aktivátory buněčné smrti (Smac/DIABLO; Omi/HTRA2) uvolněnými z mezimebránového prostoru mitochondrií následkem jejich poškození (viz dále). Vysokou expresi IAPs lze detekovat u celé řady nádorových tkání, u nichž se často uvádí jako jeden z faktorů limitujících účinnost chemoterapie (Tamm et al., 2000).

Velmi významnou skupinu intracelulárních inhibitorů tvoří také tzv. c-FLIPs (FADD-like ICE (FLICE)-inhibitory proteins) proteiny, které vysoce specificky regulují aktivaci kaspasy-8 (Irmler et al., 1997). U savců vede alternativní sestřih c-FLIP ke vzniku dvou variant rozdílných velikostí, označovaných jako c-$FLIP_S$ (short) a c-$FLIP_L$ (long), z nichž c-$FLIP_L$ vykazuju vyšší stabilitu a strukturní podobnost s kaspasou-8. Zvýšená hladina c-FLIP je spojována s rezistencí některých typů nádorů (např. melanomy) k apoptóze zprostředkované receptory smrti (French a Tschopp, 1999a).

3.2.4 Syntetické inhibitory kaspas

Syntetické kaspasové inhibitory byly vyvinuty v 90. letech jednak jako nástroj pro systematický výzkum buněčné smrti a rovněž s nadějí na jejich potenciální využití v klinické praxi. Tyto inhibitory vystupují jako pseudosubstráty pro aktivní kaspasy a působí tedy jako inhibitory kompetitivní. Jsou tvořeny sekvencí obvykle čtyř aminokyselin, které určují specifitu ke konkrétní kaspase. K aminokyselinovému motivu je za zbytkem kyseliny asparagové připojena funkční skupina. Kaspasové inhibitory vybavené aldehydickou skupinou (CHO) působí jako reversibilní inhibitory, zatímco fluoromethylketon (FMK), chloromethylketon (CMK) či fluoroacyloxymethyl (FAOM) reagují s –SH skupinou cysteinu v aktivním místě kaspas za vzniku kovalentní vazby a inhibitory nesoucí tyto funkční skupiny jsou tedy ireversibilní (Van Noorden, 2001; Dolle et al., 1994). V rámci halomethylketonových reziduí projevuje fluoromethylketon nižší reaktivitu než chloromethylketon, což přispívá k jeho vyšší selektivitě. Analogicky jako v případě syntetických kaspasových substrátů byla připravena také široká škála relativně selektivních, reversibilních i ireversibilních inhibitorů všech známých kaspas (Nicholson, 1996). Hlavním cílem jejich aplikace bylo uvést do vztahu specifické apoptotické události či aktivace cytokinů a specifické kaspasy za ně zodpovědné. V praxi se však ukázalo, že tyto inhibitory nevykazují specifitu nezbytnou pro selektivní inhibici odpovídajících kaspas.

Snížením počtu aminokyselin určujících selektivitu na tři nebo dokonce až na jednu lze připravit inhibitory, které inhibují všechny kaspasy bez rozdílu (tzv. všeobecné kaspasové inhibitory). Použitím těchto značně neselektivních inhibitorů (např. z-VAD-fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)fluoromethyl ketone)), se podařilo *in vitro* prokázat klíčovou úlohu kaspasových proteas v procesu apoptózy. Jejich aplikace v konkrétních experimentálních systémech rovněž naznačily, že inhibice kaspas nemusí nutně ochránit buňky před smrtí, nýbrž pouze zabrání některým biochemickým a morfologickým projevům apoptózy (Hirsch et al., 1997). Pro tyto případy nacházíme v literatuře často označení „caspase independent cell death“. Tento termín je ovšem napadnutelný hned z několika důvodů, neboť všeobecné kaspasové inhibitory: i) nejsou schopny systematicky inhibovat všechny kaspasy; ii) jejich účinnost a specifita vůči jednotlivým kaspasám je rozdílná nebo iii) mohou inhibovat také jiné nepříbuzné cysteinové proteasy (kathepsín B a H; Schotte et al., 1999). Dříve

velmi oblíbený inhibitor z-VAD-fmk byl již překonán inhibitory s lepšími vlastnostmi. Do popředí se dostává teprve nedávno vyvinutý všeobecný kaspasový inhibitor Q-VD-OPH (quinolyl-Val-Asp(OMe)-[2,6-difluorophenoxy)]-methylketone), který je ve srovnání s z-VAD-fmk daleko specifičtější a k jeho přednostem patří také vyšší účinnost, stabilita a nižší cytotoxicita (Chauvier et al., 2007).

Všeobecné kaspasové inhibitory na bázi modifikovaných peptidů jsou vzhledem ke svým vlastnostem (nízká buněčná permeabilita, nestabilita, omezená aktivita v intaktních buňkách) jako léčiva pro *in vivo* aplikace použitelné jen v omezené míře. Na zvířecích modelech byly popsány protektivní účinky z-VAD-fmk při poranění jater, sepsi či infarktu myokardu (Rodriguez et al., 1996; Yaoita et al., 1998; Hotchkiss et al., 2000). Pozitivního efektu se podařilo *in vivo* dasáhnout také v případě Q-VD-OPH (Yang et al., 2004). Farmaceutické společnosti začaly v nedávné době vyvíjet inhibitory nepeptidické nebo peptidy-mimikující povahy, z nichž mnohé vykazují vysokou účinnost a působí již v nanomolárních koncentracích. Tyto látky atakují, podobně jako peptidické inhibitory, aktivní místo kaspas a jsou terapeuticky testovány u některých onemocnění provázených nadměrným odumíráním buněk (neurodegenerativní choroby, ischemické cévní choroby). Několik málo preparátů má již úspěšně za sebou dvě fáze klinického testování. Například látka pod označením IDN-6556 (3-{2-[(2-*tert*-butyl-phenylaminooxalyl)-amino]-propionylamino}-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-phenoxy)-valerová kyselina) je podávána pacientům s onemocněním jater a také po jaterní transplantaci (Valentino et al., 2003).

3.3 Biochemické dráhy aktivace kaspas v průběhu apoptózy

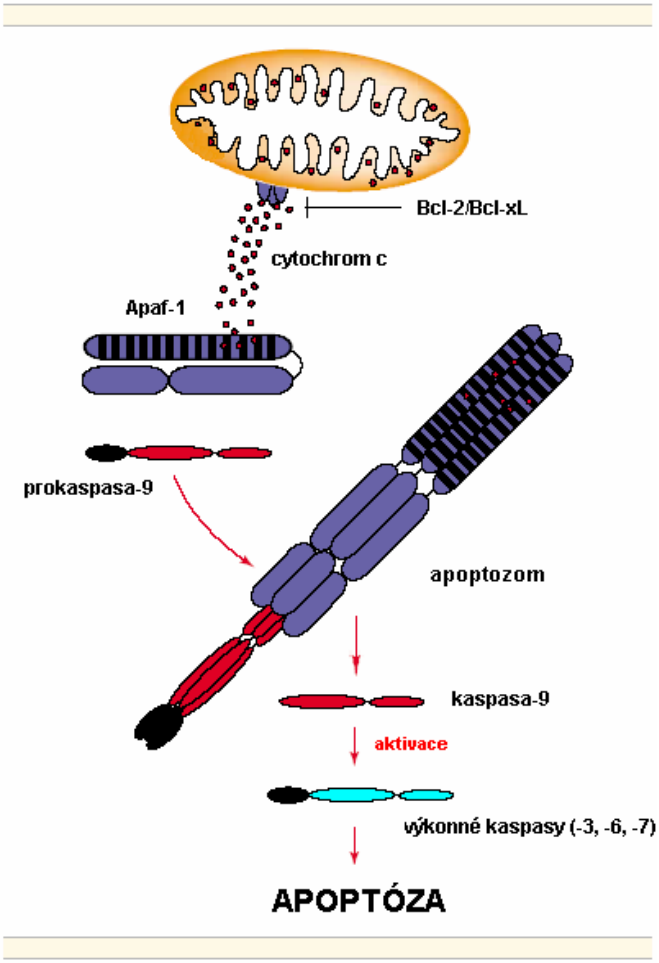
U savců byly popsány tři základní biochemické dráhy aktivace kaspasových proteas, které vedou k apoptóze: i) aktivace kaspas mitochondriální (vnitřní) dráhou; ii) aktivace kaspas prostřednictvím receptorů smrti (vnější dráha) a iii) aktivace kaspas prostřednictvím cytotoxických granulí. Ačkoliv je každá z těchto drah aktivována různorodými podněty a může probíhat individuálně, dochází velmi často k jejich vzájemnému prolínání. V konečné fázi však obvykle vyústí v aktivaci výkonných kaspas.

3.3.1 Aktivace apoptózy mitochondriální drahou

Zapojení mitochondrií do procesu apoptózy poprvé demonstroval Newmeyer se svými kolegy na nebuněčném systému (Newmeyer et al., 1994). Přibližně ve stejné době byla *in vitro* prokázána závislost jaderných morfologických změn v průběhu apoptózy na přítomnosti ATP (Lazebnik et al., 1993; Kass et al., 1996). Zřejmě nejvíce překvapující byl objev Wanga a jeho kolegů, kteří nalezli vztah mezi cytochromem *c* uvolněným z mitochondrií a aktivací výkonných kaspas (Liu et al., 1996). Dalším identifikovaným faktorem mitochondriální dráhy byl protein Apaf-1 (Zou et al., 1997). Celý mechanismus aktivace kaspas prostřednictvím mitochondrií byl však objasněn až s objevem apoptozomu, jehož složky zahrnovaly dříve objevené faktory - molekuly ATP/dATP, cytochromu *c*, Apaf-1 a prokaspasy-9. Bylo prokázáno, že apoptozom zprostředkovává aktivaci prokaspasy-9, která následně aktivuje výkonné kaspasy, což se manifestuje typickou apoptotickou morfologií (Zou et al., 1999; Obr. 11).

Aktivace kaspas prostřednictvím mitochondrií je složitý proces, který nelze omezit pouze na uvolnění cytochromu *c* a tvorbu apoptozomu. Mezimembránový prostor mitochondrií obsahuje kromě výše zmíněného hemoproteinu také některé další proteiny, tzv. aktivátory buněčné smrti (viz. dále), které se významně podílí na aktivaci kaspas nebo dokonce na přímé destrukci buňky. Uvolnění cytochromu *c* a aktivátorů buněčné smrti z mezimembránového prostoru mitochondrií je regulováno proteiny z rodiny Bcl-2 (viz. dále).

Mitochondriální apoptotická dráha může být spuštěna celou řadou stresových podnětů, jako je např. hypoxie, nedostatek růstových faktorů, hypertermie, záření (γ nebo UV) nebo některá chemoterapeutika.



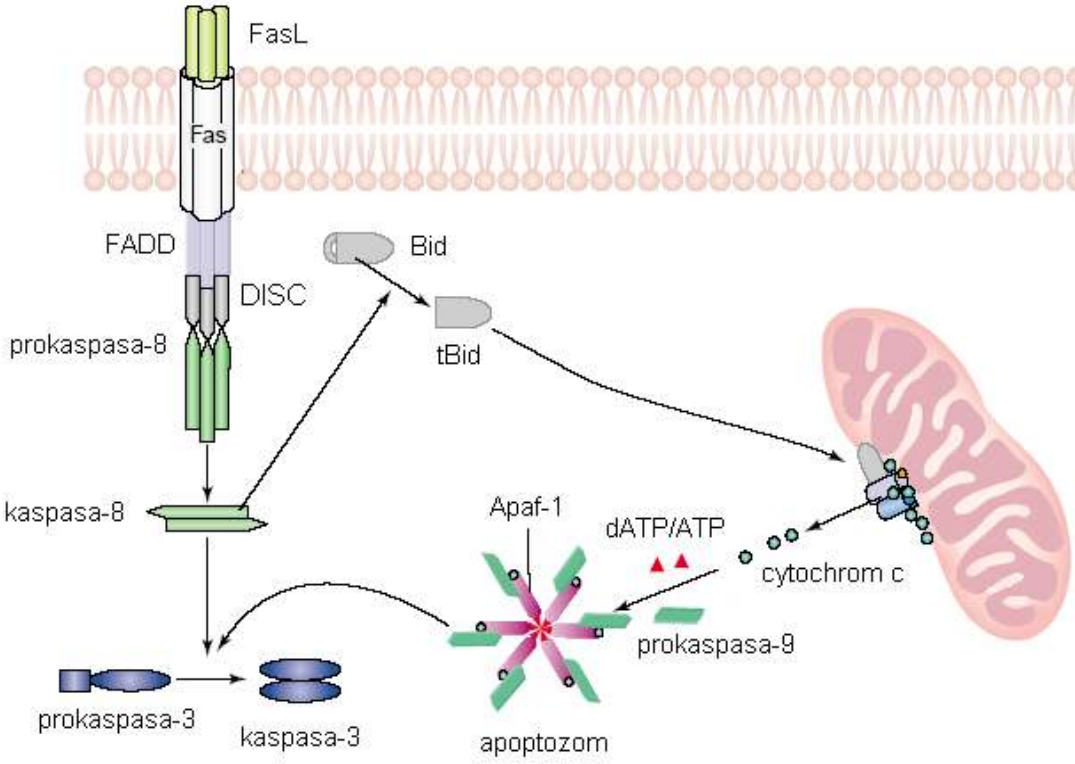
Obr. 11. Aktivace apoptózy mitochondriální drahou. Specifické stresové podněty indukují uvolnění cytochromu *c* z mezimembránového prostoru mitochondrií do cytoplazmy. V přítomnosti Apaf-1 a ATP/dATP se utváří apoptozom – aktivační komplex prokaspasy-9, která následně aktivuje výkonné kaspasy (kaspasa-3, -6 a -7). (převzato od Adrain a Martin, 2001; upraveno).

3.3.2 Aktivace apoptózy prostřednictvím receptorů smrti

Signalizace prostřednictvím tzv. receptorů smrti hraje významnou úlohu při vývoji a funkci imunitního systému (Gravestein a Borst, 1998). Tyto specializované membránové receptory schopné zprostředkovat likvidaci buněk patří do rodiny TNFR (tumor necrosis factor receptor) receptorů. Význačnou vlastností receptorů smrti je přítomnost intracelulární domény smrti (death domain; DD), klíčové pro aktivaci kaspasy-8 a -10. Spuštění receptorové signalizace je podmíněno interakcí receptoru s aktivujícím cytokinem, tzv. ligandem smrti. Tyto ligandy se primárně vyskytují jako membránově vázané proteiny, ale jsou detekovány také jako solubilní proteiny v séru (Cheng et al., 1994). K nejlépe popsaným receptorům smrti a jejich příslušným

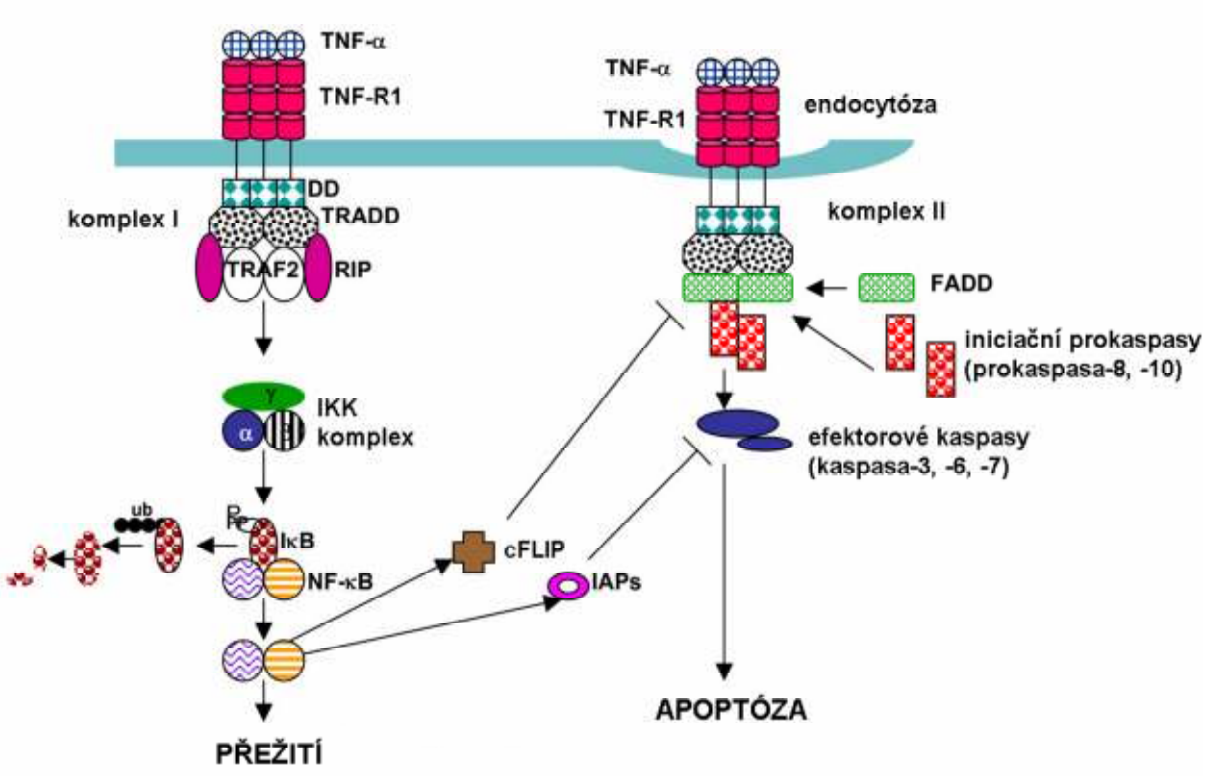
ligandům patří: i) Fas receptor (APO-1/CD95) a Fas ligand (FasL); ii) TRAIL-R1 receptor (DR4) a Apo2 ligand (Apo2L); iii) TRAIL-R2 receptor (DR5) a Apo2L; iv) TNF-R1 receptor a TNFα ligand; v) TNF-R2 receptor a TNFα ligand.

Signální dráhy aktivované ligací TRAIL-R, resp. Fas receptoru jsou velmi podobné. Ligand smrti ve formě trimeru indukuje oligomerizaci membránových molekul příslušného receptoru (Ashkanazi a Dixit, 1998). Asociace DD domény receptorových molekul vede k homotypické interakci s molekulami adaptorových proteinů a prokaspasou-8/-10. V rámci vzniklého komplexu DISC dochází k autokatalytickému štěpení kaspasových prekurzorů, jejichž aktivní formy následně aktivují výkonné kaspasy (Muzio et al., 1998). Apoptóza navozená stimulací Fas a TRAIL-R receptorů je v některých případech doprovázena uvolněním aktivátorů buněčné smrti z mitochondrií, což je důsledkem prolínání receptorové a mitochondriální dráhy prostřednictvím proteolýzy proteinu Bid kaspasou-8 nebo -10 (Li et al., 1998; Obr. 12). Aktivní forma tBid translokuje do mitochondrií a přispívá k uvolnění cytochromu *c* (Kuwana et al., 1998). Takto dochází k zesílení apoptotického signálu, které je nezbytné pro dokončení apoptotického programu u některých buněčných typů (např. hepatocyty či neuronální prekurzory). Úloha receptoru Fas spočívá především ve formování a funkci imunitního systému, tedy v eliminaci autoreaktivních T- a B-lymfocytů během klonální selekce aktivovaných T-buněk (Krammer, 2000). Aktivace TRAIL receptorů se uplatňuje přednostně při apoptóze indukované u nádorových buněk, které jsou vůči TRAIL ligandu vysoce senzitivní (French a Tschopp, 1999b).



Obr. 12. Aktivace apoptózy prostřednictvím Fas receptoru. Stimulace Fas receptoru Fas ligandem vede k vytvoření komplexu DISC a aktivaci prokaspasy-8. Aktivovaná kaspasa-8 následně přímo aktivuje výkonné kaspasy nebo alternativně zesiluje apoptotický signál štěpením Bid proteinu a aktivací výkonných kaspas mitochondriální drahou (podle Hong et al., 2004; upraveno).

Nejkomplexnější receptorovou dráhu představuje aktivace prostřednictvím TNFα. Ligace TNF-R1 receptoru indukuje signály apoptotické i proliferační, zatímco TNF-R2 receptor vzhledem k absenci DD domény zprostředkovává pouze proliferaci (Locksley et al., 2001). Interakce mezi TNFα a TNF-R1 vede nejdříve ke vzniku komplexu I, který vyvazuje komplex IκB kinasy (IKK) a prostřednictvím fosforylace IκB dochází k aktivaci NF-κB (nuclear factor κB; Obr. 13). Po endocytóze receptoru se formuje komplex II a o osudu buňky pak rozhoduje míra aktivace NF-κB. V případě, že je aktivace NF-κB nedostatečná, převáží aktivita komplexu II a dojde ke spuštění apoptózy. Naopak, pro přežití buňky je nutná právě taková aktivace NF-κB, která zajistí expresi anti-apoptotických proteinů potřebných pro inhibici aktivace (c-FLIP) či aktivity (IAPs) kaspas. V tomto případě převáží aktivita komplexu I (Micheau a Tschopp, 2003).

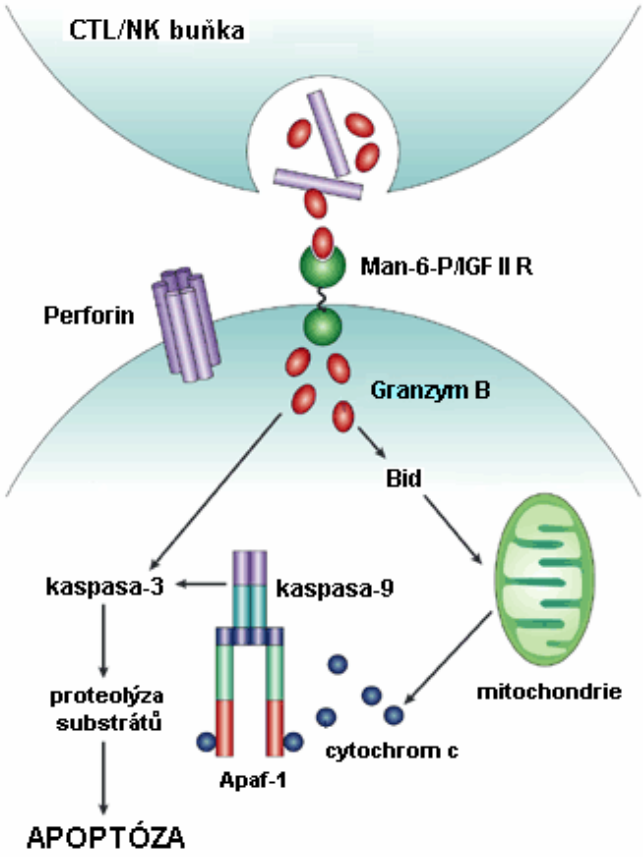


Obr. 13. Aktivace apoptózy prostřednictvím TNF-R1. Následkem ligace TNF-R1 se formuje komplex I, který aktivuje NF-κB zajišťující expresi anti-apoptotických proteinů (cFLIP, IAPs). Dostatečná aktivace NF-κB indukuje přežití prostřednictvím inhibice (pro)kaspas, v opačném případě je prostřednictvím aktivace výkonných kaspas spuštěna apoptóza. K aktivaci iniciačních prokaspas dochází v rámci komplexu II vytvořeném po endocytóze receptoru (Gupta et al., 2006; vlastní úprava).

3.3.3 Aktivace apoptózy prostřednictvím cytotoxických granulí

Tato signální dráha je zprostředkována výhradně cytotoxickými T-lymfocyty (CTLs) nebo NK (natural killer) buňkami, které se podílí na likvidaci buněk infikovaných viry, nádorových buněk a jiných buněk, které znamenají pro organismus potenciální nebezpečí. Zatímco CTLs mohou u cílových buněk indukovat smrt sekrecí cytotoxických granulí nebo prostřednictvím specifické interakce s jejich receptory smrti, NK buňky upřednostňují první mechanismus. Cytotoxické granule obsahují perforin a serinové proteasy - granzymy (viz. dále), z nichž granzym B vykazuje nejvyšší účinnost a má rozhodující význam pro indukci buněčné smrti v cílových buňkách. Mechanismus působení obou složek granulí byl již do značné míry objasněn. Nejprve bylo prokázáno, že perforin tvoří v cytoplazmatické membráně cílových buněk póry a předpokládalo se, že granzym B prochází přes tyto póry přímo do cytozolu. Pro tuto hypotézu však existuje omezené množství experimentálních důkazů. Novější

teorie předpokládají, že granzym B specificky interaguje s membránovým receptorem man-6-P/IGF II R (mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor) a poté proniká do cílové buňky endocytózou (Obr. 14). K uvolnění granzymu B do cytozolu dochází až následkem prasknutí endozomu účinkem perforinu (Froelich et al., 1996). Granzym B po uvolnění do cytozolu přímo aktivuje kaspasu-3 nebo alternativně spouští mitochondriální dráhu prostřednictvím proteolýzy proteinu Bid (Barry a Bleackley, 2002; Obr. 14). Podrobněji bude o granzymech pojednáno v kapitole věnující se serinovým proteasám.



Obr. 14. Aktivace apoptózy prostřednictvím cytotoxických granulí. CTLs nebo NK buňky specificky indukují u cílových buněk apoptózu prostřednictvím cytotoxických granulí, které obsahují účinné složky – perforin a granzym B. Granzym B proniká do cílové buňky endocytózou po vazbě na receptor man-6-P/IGF II R. Perforin zajišťuje v cílové buňce uvolnění granzymu B do cytoplazmy, kde tato serinová proteasa přímo aktivuje kaspasu-3 nebo štěpí Bid protein a spouští mitochondriální dráhu aktivace kaspas (podle Stassi a De Maria, 2002; vlastní úprava).

3.4 Mitochondrie a buněčná smrt

Z hlediska regulace buněčné smrti zaujímají mitochondrie mezi ostatními buněčnými organelami výsadní postavení. Jak je patrné z předešlého textu, mitochondrie se uplatňují nejen při aktivaci kaspas „mitochondriální drahou“, ale za určitých podmínek přispívají také k aktivaci kaspas zprostředkované receptory smrti nebo cytotoxickými T lymfocyty.

Mitochondrie nerozhodují pouze o smrti apoptotické, ale rovněž i o smrti nekrotické. Dnes už víme, že buněčná smrt, a to apoptotická i nekrotická, je spjata s permeabilizací mitochondriálních membrán. Ačkoliv mechanismy permeabilizace mitochondriálních membrán nejsou zcela objasněny, existují všeobecně akceptované teorie podpořené řadou experimentů, které více či méně konzistentně vysvětlují tento jev (Costantini et al., 2000).

Permeabilizace vnější mitochondriální membrány vede k uvolnění tzv. aktivátorů buněčné smrti z mezimembránového prostoru do cytozolu (viz. kapitola 3.4.1). Za situace, kdy nejsou inhibovány kaspasy nebo není podstatným způsobem vyčerpána zásoba ATP, vede tento jev k indukci apoptózy. Permeabilizace vnější mitochondriální membrány je regulována proteiny Bcl-2 rodiny a bude o ní podrobněji pojednáno v kapitole 3.4.2.

Permeabilizace vnitřní mitochondriální membrány je regulována multimerním proteinovým komplexem, který se nazývá permeability transition pore (PTP) a je tvořen VDAC (voltage-dependent anion channel), ANT (adenine nucleotide translocator), hexokinasou, cyklofilinem D a dalšími proteiny. PTP pór, respektive jeho jednotlivé složky, reagují na stresové podněty v buňce a podle jejich intenzity indukují přechodné otevření tohoto póru, což vede k omezenému bobtnání mitochondriální matrix a následnému porušení vnější mitochondriální membrány, nebo při silném podnětu k trvalému otevření PTP, které je spojeno s masivním bobtnáním a prasknutím obou membrán. Přechodné otevření PTP póru je obvykle spojeno s apoptózou, trvalé otevření PTP pak indukuje nekrózou.

Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) jsou jedním ze stresových faktorů, které ovlivňují otevření PTP póru prostřednictvím interakce s ANT. Energetický stav buňky

je rovněž důležitým faktorem působícím na otevírání PTP póru. ATP a ADP patří mezi fyziologické ligandy ANT, které brání otevření PTP póru. Pokles hladiny ATP (ADP) naopak podporuje jeho otevření. PTP pór je také velmi citlivým senzorem hladiny Ca^{2+} iontů. Zvýšená hladina Ca^{2+} opět vede k jeho otevření (Costantini et al., 2000).

3.4.1 Aktivátory buněčné smrti

Kromě cytochromu *c* asociovaného s vnější stranou vnitřní mitochondriální membrány, řadíme k tzv. aktivátorům buněčné smrti ještě následující proteiny: Omi/HtrA2, Smac/Diablo, AIF (apoptotický indukční faktor) a endonukleasu G (Endo G).

Omi/HtrA2 přispívá k aktivaci buněčné smrti dvěma způsoby. Jednak nepřímo podporuje aktivaci kaspas vazbou na jejich endogenní inhibitory (IAPs), a protože se jedná o serinovou proteasu, podílí se také přímo na proteolytickém rozkladu buňky (Hegde et al., 2002). Proteasová aktivita Omi/HtrA2 bude podrobněji rozebrána v kapitole věnující se serinovým proteasám.

Smac/Diablo se podobně jako Omi váže v cytoplazmě na IAPs, čímž se nepřímo podílí na aktivaci kaspas (Du et al., 2000).

AIF je mitochondriální flavoprotein s NADH oxidasovou aktivitou (Miramar et al., 2001). Po uvolnění do cytozolu translokuje do jádra, kde indukuje kondenzaci chromatinu a štěpení DNA na vysokomolekulární fragmenty (Susin et al., 1999; Daugas et al., 2000). V řadě buněčných systémů byla popsána úloha AIF také při aktivaci apoptózy bez účasti kaspas (Pardo et al., 2001; Cregan et al., 2002). Samotný AIF postrádá vnitřní DNasovou aktivitu, avšak může interagovat s jinou endonukleasou a podpořit její aktivaci nebo aktivitu (Ye et al., 2002). V tomto ohledu byl popsán komplex AIF s endonukleasou G (viz. níže) a známá je také asociace AIF s cyklofilinem A (Wang et al., 2002; Candé et al., 2004). Úloha AIF při apoptóze může být potlačena cytoprotektivním účinkem proteinu HSP70 (heat shock protein; Ravagnan et al., 2001). Tento efekt se projevuje obvykle u nádorových linií, z nichž řada vykazuje zvýšenou expresi proteinu HSP70 (Nylandsted et al., 2000; Garrido et al., 2003).

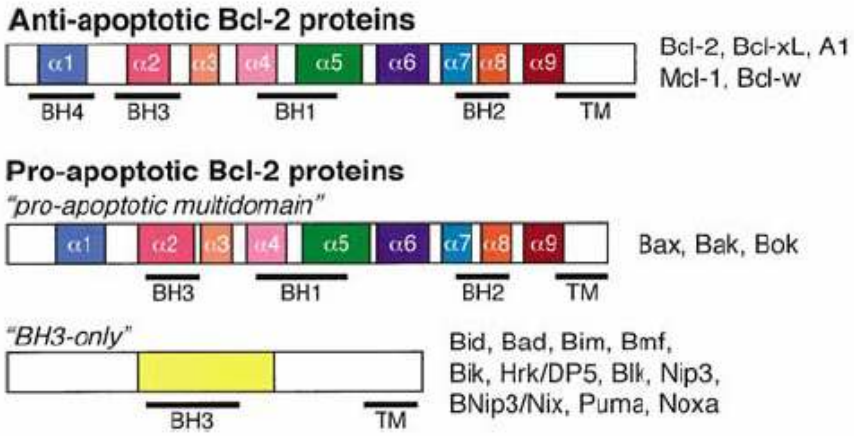
Endonukleasa G (EndoG) je nejhojnější mitochondriální nukleasou eukaryotických buněk. Po působení různorodých apoptotických podnětů se EndoG uvolňuje z mitochondriálního mezimembránového prostoru do cytoplazmy a poté translokuje do jádra, kde způsobuje nukleosomální fragmentaci DNA (Li et al., 2001). EndoG tedy vykazuje obdobný účinek jako CAD, ačkoliv nutnost spoluúčasti kaspas na její aktivaci je sporná (van Loo et al., 2001; Arnoult et al., 2003). Pokud uvážíme, že aktivita CAD, EndoG i DNasy I způsobuje nukleosomální fragmentaci DNA, nabízí se možnost vzájemné kooperace těchto nukleas vedoucí ke zvýšenému rozsahu štěpení DNA (Widlak et al., 2001). Zajímavá je také možnost substituce účinku CAD endonukleasou G v jistých buněčných typech s bohatým obsahem mitochondrií či omezenou funkcí CAD (např. hepatocyty a neurony; Nagata, 2005).

Výše zmíněné faktory nejsou jedinými proteiny, které jsou uvolněny z mezimembránového prostoru mitochondrií následkem permeabilizace vnější mitochondriální membrány. Ukázalo se, že mezimembránový prostor obsahuje řadu dalších proteinů, jako např. FABP1 (fatty acid-binding protein), PTB (polypyrimidine tract-binding protein) nebo ACBP (acyl CoA-binding protein), avšak jejich aktivní podíl na regulaci buněčné smrti prozatím nebyl zcela objasněn (Saelens et al., 2004).

3.4.2 Bcl-2 proteiny

Permeabilizace vnější mitochondriální membrány je považována za klíčovou událost především v procesu apoptózy. V buňce jsou vyvinuty mechanismy, které kontrolují integritu vnější mitochondriální membrány. Klíčové proteiny, které se podílí na regualci tohoto procesu patří do rodiny Bcl-2 (Strasser, 2005). Zástupce této široké rodiny lze podle jejich funkce rozdělit na tzv. pro-apoptotické, které podporují permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, a tím aktivaci výkonných kaspas a tzv. anti-apoptotické, které působí jiným mechanismem. Do druhé skupiny patří mj. proteiny Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-B, Bcl-w, A1 a Mcl-1. Tyto proteiny sdílí čtyři Bcl-2 sekvenčně homologní domény BH1-BH4 (Obr. 15). Výjimku tvoří protein Mcl-1, který obsahuje pouze tři BH domény (Strasser, 2005). Anti-apoptotické Bcl-2 proteiny jsou lokalizovány na cytoplazmatické straně membrán buněčných organel, jako je vnější mitochondriální membrána, jaderná membrána či membrána endoplazmatického retikula (Lithgow et al., 1994).

Proapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny vykazují nižší stupeň homologie a lze je dále členit podle struktury na dvě podskupiny. První zahrnuje tzv. multidoménové (BAX-like) proteiny (BAX, BAK, Bok/Mtd, Bcl-G a Bfk), které sdílí tři nebo minimálně dvě BH domény a strukturně jsou velmi blízké svým anti-apoptotickým protějškům (Obr. 15). Druhou podskupinu tvoří tzv. jednodoménové (BH3-only) proteiny, jejichž homologie se omezuje pouze na krátkou BH3 doménu tvořenou devíti aminokyselinami (Huang a Strasser, 2000; Obr. 15). Mezi zástupce této podkupiny patří proteiny Bad, Bik, Hrk, Bid, Bim, Noxa, Bmf nebo PUMA.

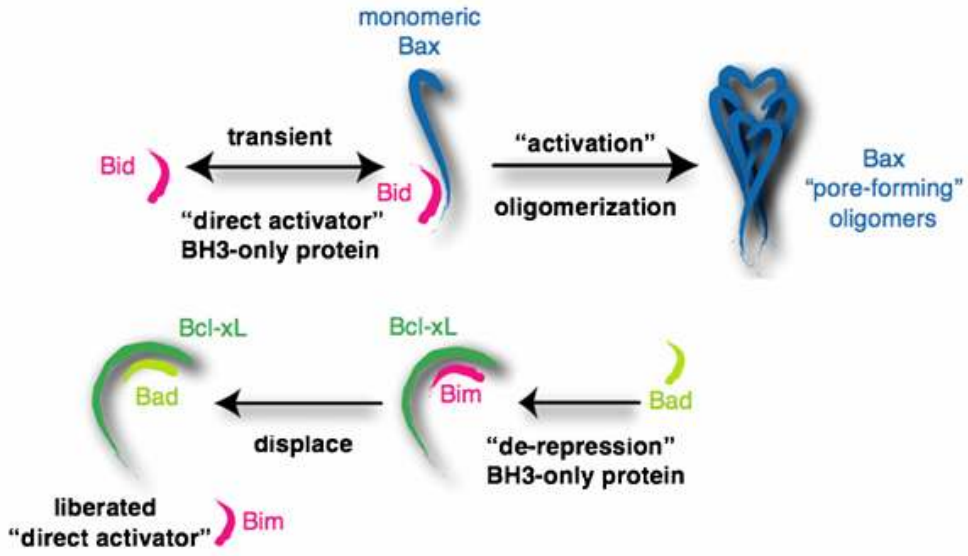


Obr. 15. Srovnání struktur zástupců Bcl-2 rodiny proteinů a jejich funkční rozdělení. Všechny Bcl-2 proteiny sdílí minimálně jednu ze čtyř Bcl-2 homologních (BH) domén a až na některé jednodoménové (BH3-only) proteiny (Bad, Bid) nesou všechny na C-konci transmembránovou (TM) doménu, která jim umožňuje interakci s membránami (podle Chipuk et al., 2006).

Mutační analýzy odhalily skutečnost, že BH3 doména hraje důležitou roli při jejich interakci s anti-apoptotickými Bcl-2 proteiny. Typickým příkladem je interakce Bad proteinu s Bcl-xL. Jednodoménové Bcl-2 proteiny působí jako citlivé sensory apoptotických podnětů, jež se nepřímo podílí na aktivaci kaspasové kaskády. V savčích buňkách bylo identifikováno nejméně 10 různých BH3-only proteinů a jejich působení je tak do značné míry komplexní. Díky „knock-out" experimentům na myších se však podařilo přiřadit jednotlivým proteinům jejich hlavní role.

Strukturní rozdíly mezi multidoménovými a BH3-only proapoptotickými Bcl-2 proteiny úzce souvisí s odlišnými mechanismy jejich účinku. Hlavní úlohou BH3-only proteinů v procesu buněčné smrti je aktivace multidoménových

pro-apoptotických proteinů (Bax, Bak). Některé BH3-only proteiny (Bid, Bim) působí jako přímé aktivátory, které prostřednictvím přechodné interakce s Bax nebo Bak proteinem indukují otevření vnější mitochondriální membrány a uvolnění pro-apoptotických faktorů do cytozolu (Obr. 16). Jiné BH3-only proteiny (Bim) aktivují Bax nebo Bak nepřímo za účasti dalšího BH3-only proteinu (Bad) s funkcí tzv. derepresoru. Funkce derepresoru spočívá v interakci s Bcl-xL proteinem, což vede k osvobození a aktivaci vlastního BH3-only aktivačního proteinu (Chipuk et al., 2006; Obr. 16).

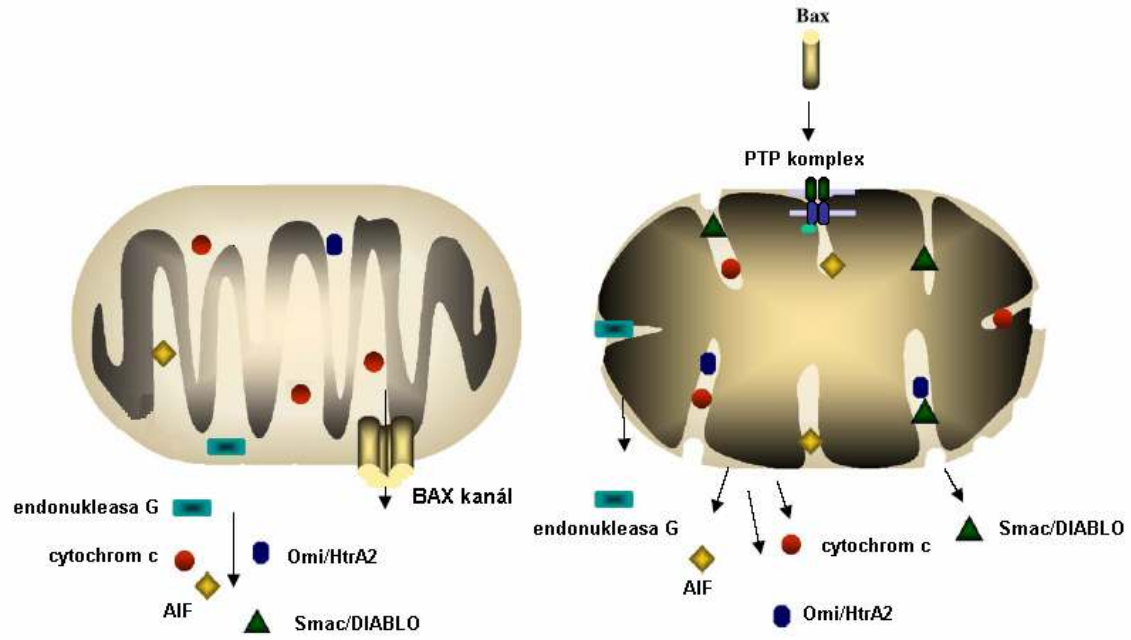


Obr. 16. Mechanismy aktivace pro-apoptotických multidoménových Bcl-2 proteinů účinkem BH3-only proteinů. Některé BH3-only proteiny (Bid) působí jako přímé aktivátory Bax proteinu, zatímco jiné (Bim) vyžadují pro aktivaci působení tzv. derepresoru (Bad), (podle Chipuk et al., 2006; upraveno).

Proapoptotické účinky BH3-only proteinů podléhají přísné regulaci, a to na úrovni transkripce nebo posttranslačních modifikací (Huang a Strasser, 2000). Příkladem transkripční regulace je exprese proteinů PUMA a Noxa indukovaná nádorovým supresorem p53 v důsledku poškození DNA. Typickým příkladem posttranslační modifikace je fosforylace proteinu Bad proteinkinasou Akt/PKB v buňkách stimulovaných růstovými faktory nebo proteolytické štěpení Bid proteinu kaspasou-8.

Na rozdíl od jednodoménových proapoptotických Bcl-2 proteinů mají proteiny multidoménové schopnost přímé indukce buněčné smrti prostřednictvím permeabilizace

vnější mitochondriální membrány. Mechanismus, kterým dochází k narušení celistvosti vnější mitochondriální membrány je stále předmětem debat. V současné době převažuje teorie, která předpokládá vytvoření pórů ve vnější mitochondriální membráně prostřednictvím oligomerizace multidoménových proapoptotických Bcl-2 proteinů (Bax, Bak) a následně uvolnění aktivátorů buněčné smrti, což obvykle vede k apoptotické buněčné smrti (Kroemer et al., 2007; Obr. 17). Starší teorie předpokládaly asociaci proapoptotických multidoménových Bcl-2 proteinů s PTP pórem, jež indukuje v závislosti na intenzitě aktivačního podnětu jeho přechodné nebo úplné otevření, což vyústí v apoptózu (přechodné otevření) nebo nekrózu (úplné otevření; Obr. 17).



Obr. 17. Mechanismus permeabilizace vnější mitochondriální membrány (OMM). Podle novější teorie (vlevo) dochází k porušení integrity OMM následkem oligomerizace Bax proteinu, což vede ke vzniku kanálu. Starší teorie (vpravo) předpokládá interakci Bax proteinu s PTP komplexem, bobtnání matrix a následně permeabilizaci OMM. Porušením integrity OMM dochází v obou případech k uvolnění aktivátorů buněčné smrti do cytoplazmy (podle Donovan a Cotter, 2004; vlastní úprava).

3.5 Nekaspasové proteasy v procesu buněčné smrti

Úloha proteas v procesu buněčné smrti je známa již více než tři desetiletí. Na počátku 70. let, kdy bylo navrženo morfologické rozlišení apoptózy a nekrózy, se uvažovalo o možné aktivaci proteas pouze v souvislosti s procesem nekrózy. Vědělo se, že nekróza je chaotický proces provázený bobtnáním buňky, porušením integrity cytoplazmatické membrány, rozpadem organel a následně celé buňky. Předpokládalo

se, že za tyto morfologické změny zodpovídají proteasy. Primárně se spekulovalo o účasti kathepsínů uvolněných do cytoplazmy z masivně poškozených lysozomů. Další proteasy, které byly dávány do souvislosti s procesem nekrózy byly kalpainy. Předpokládalo se, že narušená integrita cytoplazmatické membrány vede k influxu a zahlcení buňky vápenatými ionty, které působí jako aktivátory kalpainů.

Na konci 80. let se stále více uvažovalo o možné úloze proteas také v procesu apoptózy. Vůbec prvními kandidáty, jež by se mohly aktivně účastnit proteolytických událostí v průběhu apoptózy, byly serinové proteasy, což bylo nepřímo prokázáno experimenty se syntetickými inhibitory serinových proteas (Ruggiero et al., 1987; Suffys et al., 1988). Mechanismus apoptózy však byl objasněn až s objevem kaspas, které jsou dodnes považovány za klíčové apoptotické proteasy. Následný intenzivní výzkum kaspas pomohl odhalit také další aktivní účastníky apoptotického programu. Zájem vědců se přitom soustředil především na otázku regulace aktivity kaspas, a to jak na úrovni fyziologické, tak také s využitím syntetických inhibitorů. *In vitro* experimenty v řadě buněčných systémů vedly ke zjištění, že inhibice kaspas nemá tak zásadní význam pro přežití buněk, jak se předpokládalo (Hirsch et al., 1997). Bylo tedy zřejmé, že regulace procesu apoptózy je mnohem komplexnější a v buňce musí nutně existovat i další mechanismy, do nichž jsou zapojené takové proteasy, které jsou schopny kaspasy funkčně zastoupit nebo s nimy vzájemně kooperovat. Ukázalo se, že kromě kaspas a výše zmíněných serinových proteas, se mohou na proteolytickém rozkladu buněk v průběhu apoptózy podílet také další nekaspasové proteasy, především kathepsíny a kalpainy.

3.5.1 Kathepsíny

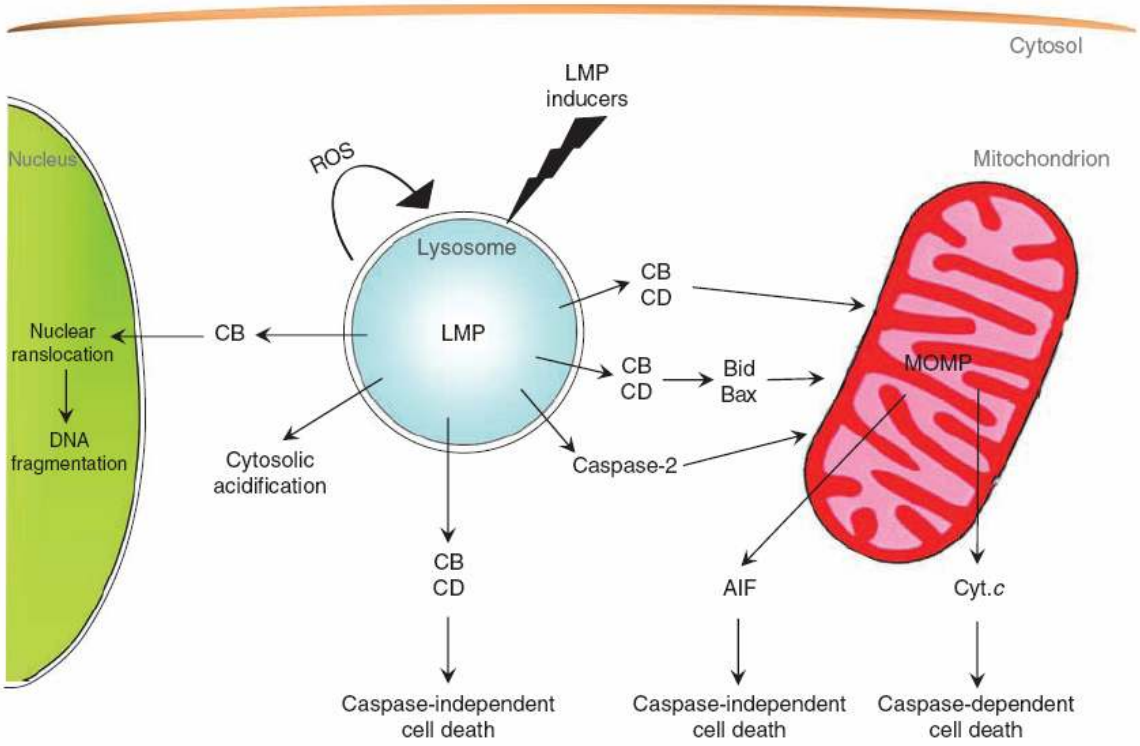
Kathepsíny představují širokou rodinu cysteinových, aspartátových a serinových proteas. Tyto proteasy jsou za fyzilogických podmínek lokalizovány v lysozomech, avšak po indukci buněčné smrti se uvolňují do cytoplazmy. Nutno podotknout, že kathepsíny uvolněné do cytoplazmy již vystupují v katalyticky aktivní monomerní formě a ke štěpení jejich proenzymů dochází obvykle ještě uvnitř lysozomů (Ishidoh a Kominami, 2002). Zatímco podíl lysozomálních proteas na nekrotickém rozkladu buňky je znám již víc jak tři desetiletí, zapojení kathepsínů do regulace apoptózy bylo prokázáno teprve nedávno. Jedním z důležitých aspektů bránících poznání úlohy

kathepsínů v procesu apoptózy je skutečnost, že některé syntetické kaspasové inhibitory využívané při výzkumu apoptózy mají ve vyšších koncentracích nespecifické účinky také na lysozomální cysteinové proteasy, čímž je maskují (Foghsgaard et al., 2001; Turk a Stoka, 2007). Z dnešního pohledu je permeabilizace lysozomální membrány (LMP) považována za jeden z obecně platných mechanismů jež přispívají k buněčné smrti, přičemž rozsah poškození lysozomální membrány je hlavním faktorem určujícím charakter smrti. Pokud dojde k masivnímu poškození a membrána je zcela porušena, pak lysozomy podněcují nekrotický zánik buňky. Naopak parciální a selektivní poškození membrány indukuje spíše apoptózu (Guicciardi et al., 2004; Kroemer a Jäättelä, 2005). O tom, která konkrétní dráha bude dominantně aktivována po translokaci kathepsínů do cytoplazmy, rozhoduje řada faktorů, mezi něž patří typ poškozené buňky, intenzita smrtícího stimulu, expresní hladina lysozomálních hydrolas, cytozolární koncentrace kathepsínových inhibitorů, funkční stav mitochondrií či koncentrace kaspas a jejich antagonistů.

Dosavadní výzkum nazančil, že nejužší vztah k regulaci apoptózy mají kathepsin B, kathepsin L (cysteinové proteasy) a kathepsin D (aspartátová proteasa; Hishita et al., 2001; Ishisaka et al., 1999). Aktivita těchto proteas je spojována s řadou morfologických či biochemických projevů apoptózy k nimž patří kondenzace chromatinu, degradace intracelulární matrix, aktivace prokaspas či externalizace fosfatidylserinu (Roberts et al., 1999; Leist a Jäättelä, 2001). Kathepsíny mohou štěpit široké spektrum substrátů, zahrnující například zástupce Bcl-2 rodiny (Bid, Bax), proteiny podílející se na regulaci buněčného cyklu (p53, cyklin D) či transkripční faktory (c-Fos, c-Jun) (Johnson, 2000).

Hlavní signální dráhy směřující k buněčné smrti následkem LMP dokumentuje Obr. 18. Mitochondriemi produkované reaktivní kyslíkové radikály (ROS) indukují LMP, což vede k uvolnění kathepsínů B a D do cytoplazmy. Cílem kathepsínu B a D je mitochondrie, kde indukují permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (MOMP), uvolnění cytochromu *c* a aktivaci výkonných kaspas (Roberg a Ollinger, 1998; Roberg et al., 1999). Podstatnější úlohu v rámci této signální dráhy zřejmě sehrává kathepsin D, neboť endogenní inhibitory kathepsinu B (např. cystatiny) blokují jeho proteasovou aktivitu. K poškození lysozomální membrány může dojít také účinkem ROS produkovaných vlastními lysozomy, pokud v nich dojde k nahromadění

železa (Eaton a Qian, 2002). Signalizace propujující LMP s MOMP může být zprostředkována také nepřímo prostřednictvím proteolýzy proteinu Bid. Ačkoliv byla v *in vitro* systémech prokázána spoluúčast celé řady kathepsínů (kathepsin H, L, S a K) na aktivaci Bidu, rozhodující se ukázala být aktivita kathepsínů D a B (Cirman et al., 2004; Nagaraj et al., 2006; Heinrich et al., 2004). Aktivace kathepsínů může v některých buněčných systémech vést k buněčné smrti také bez účasti kaspas či jiných proteas (Bröker et al., 2004; Garnett et al., 2007). Vzhledem k tomu, že k LMP dochází často v souvislosti s masivním oxidativním stresem, nelze vyloučit inaktivaci kaspas jejich oxidací účinkem ROS (Mannick et al., 2001). Dalším možným pojítkem mezi LMP a MOMP může být za jistých okolností aktivace kaspasy-2. Předpokládá se, že kathepsin B může po uvolnění do cytoplazmy aktivovat kaspasu-2, která následně zprostředkuje MOMP (Yeung et al., 2006). Byly popsány také případy, kdy kathepsin B translokuje do jádra a indukuje kondenzaci chromatinu (Vancompernolle et al., 1998).



Obr. 18. Hlavní signální dráhy vedoucí k buněčné smrti následkem LMP. Signalizace se účastní celá řada různých efektorových molekul, které v závislosti na mnoha okolnostech určují výsledný charakter buněčné smrti. AIF – apoptotický indukční faktor; CB – kathepsin B; CD – kathepsin D; Cyt. c – cytochrom *c*; MOMP – permeabilizace vnější mitochondriální membrány (obrázek převzat od Boya a Kroemer, 2008).

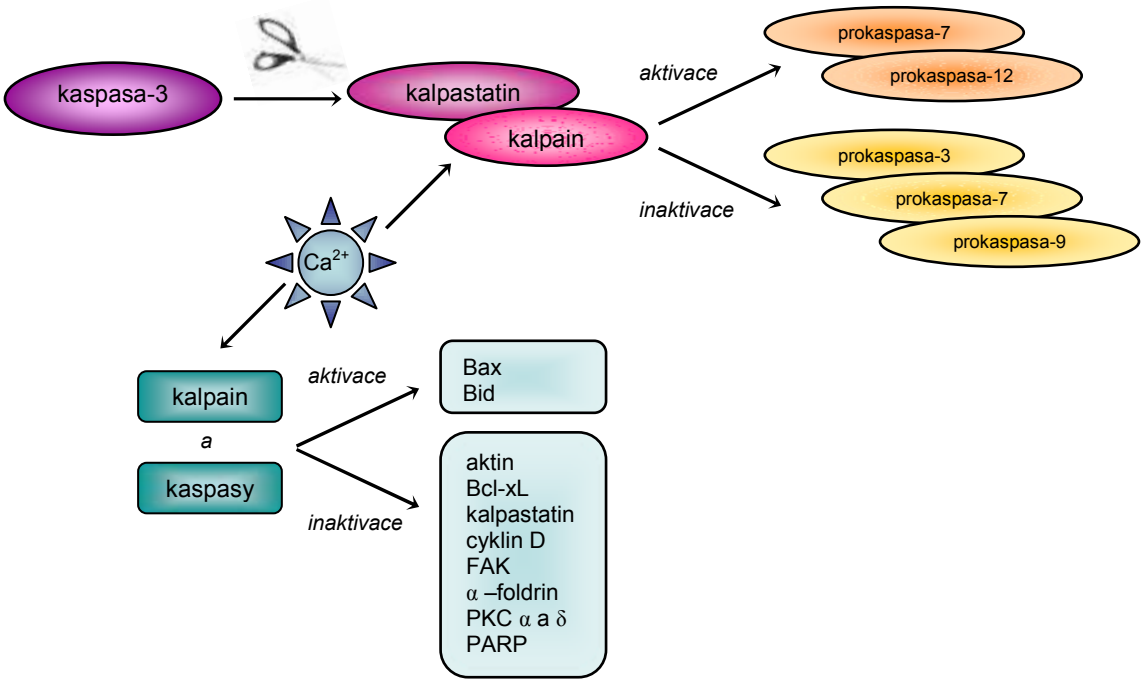
3.5.2 Kalpainy

Kalpainy tvoří rodinu cytoplazmatických cysteinových proteas, z nichž některé jsou exprimované ve všech tkáních, zatímco jiné jsou tkáňově specifické (Murachi et al., 1980; Sorimachi et al., 1994). Z prvně jmenovaných jsou v nejvyšší míře zastoupeny dvě isoformy - μ-kalpain (kalpain I) a m-kalpain (kalpain II). Oba kalpainy se vyskytují v cytoplazmě ve formě neaktivních prekurzorů a tvoří heterodimery složené z malé (~30 kDa) regulační podjednotky a velké (~80 kDa) katalytické podjednotky (Sasaki et al., 1983). Aktivace a aktivita kalpainů je ovlivněna řadou faktorů. Kalpainy jsou *in vitro* aktivovány anomálně zvýšenou koncentrací vápenatých iontů v cytoplazmě (koncentrace v řádu μM pro μ-kalpain, resp. mM pro m-kalpain; Croall a DeMartino, 1991). Na fyziologické úrovni je jejich aktivita regulována endogenním, vysoce specifickým inhibitorem kalpastatinem (Emori et al., 1987). Kalpainy mohou také podléhat autokatalytickému štěpení následkem vazby s Ca^{2+}, která vede ke zvýšení jejich aktivity a snižuje nároky na Ca^{2+} (Imajoh et al., 1986; Inomata et al., 1988). Stále ovšem zůstává rozporuplné, nakolik autokatalýza kalpainů skutečně přispívá k jejich aktivaci.

V souvislosti s výzkumem buněčné smrti byly kalpainy, podobně jako kathepsíny, řadu let spojovány pouze s procesem nekrózy. Možný podíl kalpainů na regulaci apoptotické buněčné smrti byl poprvé demonstrován na počátku 90. let pozorováním autokatalýzy kalpainů v průběhu apoptózy indukované u thymocytů (Squìer et al., 1994). Jiným nepřímým důkazem byla ochrana buněk imunitního systému před spuštěním apoptózy po aplikaci kalpainových inhibitorů (Sarin et al., 1995). Také další studie se opíraly především o aplikaci specifických kalpainových inhibitororů, avšak brzy se ukázalo, že jejich specifita je oproti očekávání velmi omezená a získané výsledky tedy málo průkazné. Řada komerčně dostupných kalpainových inhibitorů projevuje inhibiční efekt také vůči dalším proteasám cysteinového typu (kathepsin B a L, komplex proteasomu). Účinek připisovaný na vrub kalpainům tak může ve skutečnosti odrážet aktivitu jiných proteas. Až na konci 90. let byly podány jasné důkazy o přímém podílu kalpainů na apoptotickém rozkladu buněk, když bylo prokázáno, že kalpainy jsou schopny štěpit klíčové regulační proteiny apoptotického programu, jmenovitě zástupce Bcl-2 rodiny (Bcl-xL, Bid, Bax), Apaf-1, XIAP, kaspasu-12 nebo protein p53 (Reimertz et al., 2001; Wood et al., 1998; Gao a Dou,

2000; Chen et al., 2001; Atencio et al., 2000; Kobayashi et al., 2002; Nakagawa a Yuan, 2000; Mandic et al., 2002).

Spektrum substrátů, které mohou být potenciálním cílem aktivovaných kalpainů je poměrně široké a mimo apoptotické regulátory dále zahrnuje cytoskeletální proteiny, proteiny asociované s plazmatickou membránou, transkripční faktory nebo další proteasy zapojené do regulace buněčné smrti (Carafoli a Molinari, 1998). Řada kalpainových substrátů patří zároveň mezi substráty kaspas a analogické pro obě skupiny proteas je také diskrétní štěpení cílových substrátů na stabilní proteinové fragmenty (Chan a Mattson, 1999). Jistě tedy není překvapující provázanost signálních drah kalpainů a kaspas, což výrazně komplikuje porozumění jejich konkrétních úloh v rámci apoptotického programu. Výsledky, které se týkají vzájemných interakcí kaspas a kalpainů jsou rozporuplné a ukazují, že úloha kalpainů se do značné míry odvíjí od typu studované buněčné linie a charakteru apoptotického podnětu. Zatímco v některých případech jsou kalpainy schopny štěpit kaspasy (-3, -7, -9), čímž je inaktivují (Neumar et al., 2003; Chua et al., 2000), v jiných buněčných systémech naopak podmiňuje proteolýza kaspas (kaspasa-7 a -12) kalpainy jejich aktivaci (Nakagawa a Yuan, 2000). Kalpainy tedy mohou vystupovat jako pozitivní i negativní regulátory kaspas. V jiných experimentálních systémech může naopak aktivace kaspas předcházet aktivaci kalpainů, které pak vystupují jako substráty kaspas nebo jsou nepřímo aktivovány prostřednictvím proteolýzy kalpastatinu kaspasami (Wood a Newcomb, 1999; Pörn-Ares et al., 1998). Kalpastatin může za jistých okolností podléhat také proteolýze účinkem vlastních kalpainů (Blomgren, 1999). Kromě interakcí kalpainů s kaspasami byla popsána také tzv. „kalpain-kathepsínová kaskáda“, v níž aktivované kalpainy indukují uvolnění lysozomálních kathepsínů, což vede k buněčné smrti bez účasti kaspas (Yamashima et al., 1998).



Obr. 19. Možné interakce kalpainů a kaspas v průběhu apoptózy. Aktivace kalpainů může předcházet aktivaci kaspas nebo naopak mohou kalpainy vystupovat jako přímé substráty již aktivovaných výkonných kaspas. K aktivaci kalpainů kaspasami dochází také nepřímo prostřednictvím proteolýzy kalpastatinu. Aktivované kalpainy se podílí na apoptotickém rozkladu buněk proteolytickým štěpením širokého spektra substrátů. FAK = focal adhesion kinase; PARP = poly(ADP)ribose polymerase; PKC =protein kinase C.

3.5.3 Serinové proteasy

Serinové proteasy tvoří rodinu proteinů podílejících se na regulaci řady fyziologických procesů jako je trávení, srážení krve, zánět a také apoptóza. Společným znakem zástupců této rodiny je přítomnost reaktivní serinové skupiny v jejich aktivním místě, jež se podílí na katalytickém mechanismu vytvořením přechodného acyl-enzymového komplexu (Rawlings a Barrett, 1994). Složení aktivního centra dále zahrnuje zbytky histidinu a asparaginu, které stabilizují komplex, a tím usnadňují štěpení cílových substrátů. Podle vyhraněné substrátové specifity lze serinové proteasy rozdělit do třech podskupin odvozených od jejich modelových zástupců: trypsinu, chymotrypsinu a elastasy. Proteasy chymotrypsinového typu preferují aminokyseliny s aromatickými postranními řetězci (fenylalanin, tryptofan, tyrosin), trypsin štěpí cílové substráty v místě bazických skupin (lysin, arginin) a elastasa upřednostňuje malé nenabité aminokyselinové zbytky (glycin) (Rawlings a Barrett, 1994).

První důkazy o možném zapojení serinových proteas do procesu apoptózy pocházejí z konce 80. let, kdy bylo popsáno, že aplikace syntetických inhibitorů serinových proteas vede k potlačení apoptózy indukované TNF (Ruggiero et al., 1987; Suffys et al., 1988). O pár let později byla nepřímo prokázána účast serinových proteas na aktivaci endonukleas (Bruno et al., 1992). Vztah mezi apoptózou a serinovými proteasami byl dále podpořen zjištěním, že aplikace trypsinu a chymotrypsinu do nádorových buněk indukuje buněčnou smrt jež nese znaky apoptózy (Williams a Henkart, 1994). V roce 1998 Abate a kolegové zjistili, že lipopolysacharid (LPS) indukuje buněčnou smrt u makrofágů, kterou lze zcela potlačit syntetickými inhibitory serinových proteas (Abate a Schröder, 1998). Přestože tyto rané studie jasně prokázaly kauzální vztah serinových proteas k apoptóze, zůstává počet doposud popsaných specifických serinových proteas zapojených do procesu apoptózy stále značně omezený, stejně jako množství informací týkajících se mechanismu jejich působení. Objasnění specifických funkcí, jež plní konkrétní serinové proteasy v procesu apoptózy, brání především nedostatek vhodných experimentálních nástrojů, jakými jsou např. specifické protilátky. Dosud byl tak výzkum v této oblasti postaven především na objevu a aplikaci specifických inhibitorů serinových proteas (viz. kapitola 3.5.3.3). Mezi nejvýznamnější popsané serinové proteasy s přímým vztahem k apoptóze patří AP24, trombin, Omi/HtrA2 a granzymy, které budou v následujícím textu stručně popsány.

AP24 (24 kDa apoptotic protease) je serinová proteasa chymotrypsinového typu aktivovaná řadou podnětů jako je TNF, UV záření nebo různá chemoterapeutika (Wright et al., 1996; Wright et al., 1997). Aktivace této proteasy není ovlivněna inhibitory proteosyntézy, což vypovídá o její konstitutivní expresi (Wright et al., 1998). Pro-apoptotický účinek AP24 spočívá v inaktivaci LEI (leukocyte elastase inhibitor) prostřednictvím posttranslační modifikace, čímž se nepřímo podílí na procesu internukleosomálního štěpení DNA. Inaktivace LEI vede totiž ke ztrátě jeho inhibiční funkce a vzniklá forma projevuje po translokaci do jádra vlastnosti endonukleasy (L-DNase II; Torriglia et al., 1998). Aktivita AP24 může být ovlivněna řadou faktorů. Například u leukemické buněčné linie HL-60 dochází vlivem nadměrné exprese proteinu Bcl-2 k inhibici účinku AP24 (Wright et al., 1997).

Trombin patří mezi proteasy trypsinového typu a je znám především jako důležitý hematologický faktor ovlivňující srážlivost krve. V nedávné době byla spatřena

jeho významná role také v regulaci procesu apoptózy a v jeho zásahu do mitogenních signálních drah v řadě nádorových buněčných linií (Ahmad et al., 2000; Zain et al., 2000). Vysoké koncentrace trombinu potlačují *in vitro* růst nádorových buněk, jež se manifestuje zástavou buněčného cyklu a kaspasami zprostředkovanou apoptózou (Stenson-Cox et al., 2003). Zvláštností je, že se tyto účinky tronbinu projevují pouze u nádorových buněčných linií, což z něj činí zajímavý potenciální nástroj v protinádorové terapii. Normální buňky vykazují vůči trombinu mnohonásobně nižší citlivost než buňky nádorové. Například neurony či astrocyty vyžadují pro indukci buněčné smrti až 200-násobně vyšší koncentraci ve srovnání s buňkami nádorovými a nízké koncentrace trombinu jim dokonce poskytují ochranu vůči oxidativnímu stresu (Smirnova et al., 1998; Vaughan et al., 1995).

Serinová proteasa Omi/HtrA2 byla objevena v roce 2000 jako savčí homolog bakteriální endoproteasy HtrA (Faccio et al., 2000; Gray et al., 2000). Tento protein je lokalizován v mezimembránovém prostoru mitochondrií ve formě neaktivního prekurzoru. Po působení apoptotického podnětu, jež aktivuje mitochondriální dráhu, podléhá Omi autokatalytickému štěpení a vzniklá aktivní forma se uvolňuje do cytoplazmy následkem permeabilizace vnější mitochondriální membrány (Suzuki et al., 2001). V cytoplazmě plní Omi dvojí funkci. Inaktivace IAPs již byla zmíněna v předešlém textu, zde se tedy omezím pouze na popis její proteasové aktivity. Přesný mechanismus projevu proteasové aktivity Omi není dosud znám, nicméně dosavadní studie naznačují, že může jít o mechanismus nezávislý na kaspasách. Bylo dokázáno, že buněčná smrt indukovaná zvýšenou expresí Omi není potlačena působením nespecifického kaspasového inhibitoru ani v systému s deletovaným Apaf-1 či kaspasou-9 (Suzuki et al., 2001; Hegde et al., 2002). Kromě výše uvedeného se může Omi účastnit také obecné reakce buňky na stres, což bylo demonstrováno zvýšenou aktivitou Omi v ledvinové ischemické tkáni (Faccio et al., 2000). V nedávné době byl identifikován specifický inhibitor (ucf-101) proteasové aktivity Omi a známá je již také optimální substrátová sekvence pro tuto proteasu (Cilenti et al., 2003; Martins et al., 2003). Oba objevy mohou významným způsobem přispět k lepšímu porozumění a objasnění regulace a funkce tohoto proteinu.

K dalším serinovým proteasám, jež byly popsány v souvislosti s apoptózou patří myeoloblastin a specifický enzym histon H1 asociovaný s jadernou matricí.

Myeloblastin by mohl plnit v buňkách anti-apoptotickou funkci, neboť bylo prokázáno, že jeho inaktivace vede u buněčné linie HL-60 k inhibici proliferace a indukci diferenciace (Bories et al., 1989). Histon H1 asociovaný s jadernou matricí je serinová proteasa aktivovaná následkem poškození DNA v izolovaných jádrech thymocytů, jejíž aktivitu lze potlačit inhibitory proteas chymotrypsinového typu. Mechanismus je zřejmě nezávislý na aktivaci kaspas a lze jej ovlivnit zvýšenou expresí Bcl-2 proteinu (McConkey, 1996).

3.5.3.1 Granzymy

Granzymy tvoří rozsáhlou rodinu serinových proteas trypsinového, chymotrypsinového a elastasového charakteru. Jsou exprimovány výhradně cytotoxickými T-lymfocyty (CTLs) a NK (natural killer) buňkami, v nichž jsou distribuovány v rámci cytolytických granulí. Zatímco v NK buňkách jsou granule formovány během jejich vývoje, v případě CTLs je produkce granulí podmíněna jejich interakcí se specifickým antigenem (Shresta et al., 1998). Klíčová funkce granzymů spočívá v likvidaci viry infikovaných buněk či buněk pro organismus jinak potenciálně nebezpečných. Doposud bylo popsáno celkem pět různých lidských granzymů (A, B, H, K, M), z nichž nejvíce probádané jsou granzymy B a A (Grossmann et al., 2003).

Granzym B

Granzym B má mezi ostatními zástupci rodiny nejvýznamější úlohu ve vztahu k indukci apoptózy. Hlavním důvodem je fakt, že jeho substrátová specifita je velmi blízká kaspasám, neboť rovněž vykazuje schopnost štěpit cílové sekvence substrátů za reziduem kyseliny asparagové (Thornberry et al., 1997). Spektrum potenciálních substrátů granzymu B je však v porovnání s kaspasami velmi omezené. Proteasová aktivita granzymu B zahrnuje několik mechanismů. Granzym B může spustit apoptotický program přímou aktivací vybraných iniciačních kaspas, a podobně jako kaspasy, zprostředkovává proteolýzu některých klíčových buněčných proteinů, jako jsou např. PARP, ICAD nebo Bid (Heusel et al., 1994; Alimonti et al., 2001). Specifického štěpení proteinu Bid využívá granzym B k zesílení smrtícího signálu prostřednictvím mitochondriální dráhy aktivace kaspas (Sutton et al., 2000). Díky proteolýze ICAD může také významným způsobem přispívat k fragmentaci DNA

nezávisle na aktivaci kaspas. Kromě výše uvedeného působení spouští granzym B prováděcí fázi apoptózy přímou aktivací kaspasy-3.

Granzym A

Granzym A projevuje ve srovnání s granzymem B výrazně nižší apoptotickou aktivitu, což může být důsledkem velmi omezené aktivace kaspas. Pro indukci apoptózy prostřednictvím granzymu A jsou rozhodující patrně mechanismy nezávislé na aktivaci kaspas. Jeden z popsaných mechanismů zahrnuje aktivaci specifické endonukleasy GAAD (granzyme A activated DNase), což se projevuje vznikem charakteristických jednořetězcových zlomů v DNA molekule cílových buněk (Beresford et al., 2001).

3.5.3.2 Fyziologické inhibitory serinových proteas

Serpiny (serine protease inhibitors) tvoří rozsáhlou rodinu strukturně podobných fyziologických inhibitorů serinových proteas. Soudí se, že zástupci této rodiny projevují svůj inhibiční účinek na serinové proteasy chymotrypsinového typu. Serpiny se podílí na regulaci řady fyziologických procesů a v nedávné době byla prokázána jejich funkce také při regulaci buněčné smrti (Bird, 1998). Serpiny, které se podílí na regulaci apoptózy zahrnují proteiny virového původu CrmA (cytokine response modifier A), SPI1 (serine protease inhibitor 1) a PI-9 (proteinase inhibitor 9), který je specifickým inhibitorem granzymu B. Jiným popsaným serpinem je PAI-2 (plasminogen activator inhibitor 2), jehož nadměrná exprese vede k inhibici apoptózy indukované TNF u buněk HeLa a HT-180 (Kumar a Baglioni, 1991). Kromě výše uvedených protektivních účinků serpinů byly popsány také případy, kdy inhibice serinových proteas serpiny působí jako signál pro indukci buněčné smrti. Například zvýšená exprese SPI2 (serine protease inhibitor 2) je spojována s indukcí apoptózy u čichových neuronů (Thiemmara et al., 2002). Kromě serinových proteas inhibují některé serpiny také proteasy cysteinového typu. V tomto ohledu byla popsána inhibice kaspasy-1, -3 a -8 serpinem CrmA a kaspasy-1, -4 a -8 serpinem PI9 (Komiyama et al., 1994; Zhou et al., 1997; Annand et al., 1999). CrmA je dokonce považován za klasický inhibitor apoptotických signálních drah aktivovaných prostřednictvím receptorů smrti (Bird, 1998). Existují také serpiny (např. serpin 2A, hurpin), které inhibují kathepsíny cysteinového typu (K, L, B), a tím potlačují buněčnou smrt indukovanou permeabilizací lysozomální membrány (Liu et al., 2004; Welss et al., 2003; Law et al., 2006).

3.5.3.3 Syntetické inhibitory serinových proteas

Syntetické inhibitory serinových proteas (SPI) byly poprvé použity již na konci 80. let, kdy se uvažovalo o možném zapojení serinový proteas do procesu apoptózy. Komerčně dostupné SPI vystupují jako analoga substrátů projevující selektivitu vůči určité skupině příbuzných serinových proteas (např. N-tosyl-L-lysinyl-chloromethylketon (TLCK); N-tosyl-L-fenylalaninyl-chloromethylketon (TPCK)) nebo působící bez výrazné selektivity jako např. 4-(2-aminoethyl)-benzensulfonyl-fluorid (AEBSF) a diisopropylfluorofosfát (DFP). SPI se velmi často využívají ve směsi s dalšími proteasovými inhibitory (tzv. koktejly proteasových inhibitorů) jako ochrana proti nespecifické degradaci proteinů při přípravě buněčných lyzátů nebo izolaci konkrétních proteinů. Aplikace SPI v apoptotických experimentálních systémech vedla k prokázání spoluúčasti serinových proteas na proteolytickém rozkladu buněk. Na mnoha buněčných systémech bylo dokumentováno, že SPI jsou schopny potlačit některé biochemické a morfologické projevy apoptózy. Poznání konkrétní apoptotické signální dráhy zahrnující aktivaci specifické serinové proteasy je však obvykle pouze v rovině hypotetické vzhledem k existenci omezeného počtu doposud charakterizovaných serinových proteas a jejich specifických inhibitorů.

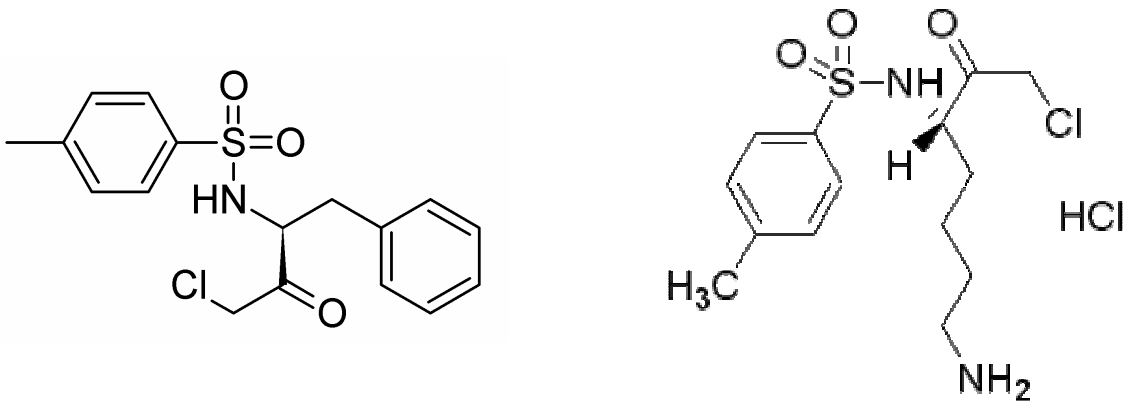
K běžně užívaným SPI patří TPCK inhibující proteasy chymotrypsinového typu, TLCK, který preferuje trypsin a příbuzné proteasy a DCI (3,4-dichloroisokumarin). TPCK a TLCK vykazují v nízkých koncentracích (<10 μM) jeden z mála selektivních učinků na DNasy. Jejich působení sice nezabrání apoptóze, avšak štěpení DNA na úroveň nukleosomů je potlačeno, což bylo prokázáno v mnoha experimentálních systémech (Gorczyca et al., 1992; Bruno et al., 1992). Podobné účinky vykazují také DCI a všeobecný inhibitor serinových proteas DFP (Oda et al., 1998).

V nedávné době byla vyvinuta fluorescenční analoga některých SPI, tzv. FLISPs (fluorescent inhibitor of serine proteases), jako např. FFCK (fluoresceinyl-L-phenylalanine chloromethylketone), který představuje fluoresceinem značený analog TPCK (Grabarek a Darzynkiewicz, 2002).

TPCK a TLCK

TPCK a TLCK jsou reaktivní slučeniny, které vedle své funkce inhibitorů serinových proteas projevují mnohočetné vedlejší biochemické účinky na buňky. Nejvíce rozporuplné výsledky se týkají vlivu TPCK a TPCK na modulaci apoptózy. Určitá skupina autorů tvrdí, že obě látky mají cytoprotektivní účinky (Weaver et al., 1993; Stefanis et al., 1997), zatímco jiní autoři naopak publikují data o tom, že TPCK a TLCK jsou cytotoxické samy o sobě nebo minimálně zesilují cytotoxické účinky jiných látek (Wu et al., 1996; Drexler et al., 1997; King et al., 2004).

TPCK **TLCK**



Obr. 20. Struktura TPCK (N-tosyl-L-fenylalaninyl-chloromethylketon) a TLCK (N-tosyl-L-lysinyl-chloromethylketon).

4 Mechanismy neapoptotických forem buněčné smrti

4.1 Nekróza

Výzkum nekrózy během několika posledních let naznačil, že i tento typ buněčné smrti může být do jisté míry uspořádaný proces, na kterém se aktivně podílí sama odumírající buňka (Zong a Thompson, 2006). Byl tak navržen nový koncept chápající nekrózu jako další typ programované buněčné smrti, neboť se ukázalo, že může využívat některé specifické signální dráhy, které jsou ovšem ve srovnání s apoptózou prozatím málo probádané. K tomuto novému pohledu na nekrózu významně přispěly rozsáhlé *in vitro* studie prováděné na buněčných systémech, v nichž byly inhibovány či inaktivovány specifické proteiny zapojené do regulace apoptózy nebo autofagie. Ukázalo se, že u buněk vystavených cytotoxickému podnětu nedochází v přítomnosti nespecifického kaspasového inhibitoru z-VAD-fmk k očekávanému zabránění buněčné smrti, ale pouze k jejímu oddálení a změně morfologie z apoptotické na nekrotickou (Hirsch et al., 1997; Festjens et al., 2006; Golstein a Kroemer, 2007). Tímto objevem byl zbořen mýtus o vzájemné protichůdnosti apoptózy a nekrózy a začalo se uvažovat o existenci jakéhosi společného programu buněčné smrti, který se v závislosti na podmínkách manifestuje jako apoptóza nebo nekróza. Ukázalo se, že průběh obou typů buněčné smrti může být za jistých podmínek kontinuální nebo probíhají oba procesy současně a prolínají se na úrovni jednotlivých organel. První práce publikovaná na toto téma ukazuje, že inhibice kaspasové aktivity u leukemické buněčné linie Jurkat nepotlačuje aktivitu proteinu Bax, který následně indukuje nekrózu (Xiang et al., 1996).

Typickým příkladem specifické biochemické dráhy indukující nekrózu je hyperaktivace poly(ADP)ribosy-polymerasy (PARP-1) v důsledku rozsáhlého poškození DNA, což vede k masivnímu poklesu zásob NAD^+ a ATP (Ha a Snyder, 1999). Míra aktivace PARP-1 je příkladem toho, jak závisí výsledná manifestace buněčné smrti na energii, respektive na dostupnosti ATP. Pokud nedojde k velmi rychlému poklesu hladiny ATP v důsledku vyčerpání zásob NAD^+, aktivují se kaspasové proteasy a buňky umírají apoptotickou smrtí.

Jako další příklad specifické biochemické dráhy, která vede k indukci nekrózy (nebo apoptózy v závislosti na dalších okolnostech) u neuronů, lze uvést aktivaci

kalpainů vápenatými ionty při mrtvici, traumatu, epilepsii, při Huntingtonově nemoci a při dalších patologických stavech, kdy selhávají fyziologické mechanismy pro regulaci hladiny glutamátu. Vysoká koncentrace glutamátu vede obvykle k otevření iontových kanálů, zejména NMDA vápenatého kanálu (N-methyl-D-aspartate calcium chanel), s následným zvýšením intracelulární koncentrace vápníku a aktivaci kalpainů, které štěpí membránový přenašeč Na^{+}/Ca^{2+} iontů, čímž se urychluje lyze neuronů (Nicotera and Bano 2003).

Důležitým mitochondriálním faktorem, který se zřejmě podílí specificky na regulaci nekrózy je cyklofilin D, jedna ze složek PTP (permeabilitry transition pore) (Nakagawa et al., 2005).

Nekróza může být dále programovaně indukována, podobně jako apoptóza, ligandy FasL nebo TNF-α prostřednictvím interakce s jejich specifickými receptory za podmínek, kdy jsou inhibovány kaspasy (Vercammen et al., 1998a+b). Klíčovou úlohu v rámci této signální dráhy zřejmě sehrává kinasa RIP1 (receptor-interacting protein 1). Primárním cílem RIP1 kinasy je pravděpodobně mitochondrie, jejíž atak vede k nadměrné produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a indukci nekrózy (Festjens et al., 2007; Lin et al., 2004). Byla popsána také interakce RIP1 kinasy s ANT (adenine nucleotide translocase), která vede rovněž k narušení funkce mitochondrií a nekrotické smrti (Temkin et al., 2006).

Častým cílem podnětů indukujících nekrózu jsou lysozomy, jejichž permeabilizace způsobená fyziologickými či patologickými podněty vede k uvolnění kathepsínů. Množství uvolněných proteas pak rozhoduje o apoptotickém či nekrotickém charakteru smrti. Tato událost je fyziologicky kontrolována prostřednictvím cystatinů, cytozolických enzymů, které působí jako reverzibilní inhibitory kathepsínů (Bursch, 2001; Guicciardi et al., 2004). Také kathepsíny patří k významným zprostředkovatelům nekrotické destrukce buněk.

Obecně lze říci, že nekrózu rozhodně nelze považovat za výsledek aktivace jediné konkrétní signální dráhy nebo působení vybraných efektorových molekul. Nekrotický zánik buňky provází vzájemná souhra mnoha biochemických a molekulárních událostí, které probíhají na různých buněčných úrovních a jsou sdíleny v rámci jiných typů programované buněčné smrti. Nekróza doprovází některé

fyziologické a patofyziologické procesy a může být velmi užitečná v protinádorové terapii při usmrcování nádorových buněk, které si vyvinuly strategie k eliminaci mechanismů apoptózy.

4.2 Autofagie

Molekulární podstata autofagie byla podrobně zkoumána především u kvasinek. Rozsáhlé genetické studie mutantů s defektní autofagií pomohly odhalit geny zapojené do tohoto procesu, které byly obecně pojmenovány jako tzv. *atg* geny (Berry a Baehrecke, 2007). Objev rodiny *atg* genů pomohl objasnit otázky týkající se tvorby autofagosomů a také dovolil porozumět fungování autofagie za podmínek přežívání buněk v nepřítomnosti růstových faktorů či nedostatečném zásobení živinami. Tyto geny byly kromě kvasinek později nalezeny také u dalších různorodých organismů od hmyzu až po savce (Levine a Klionsky, 2004).

Přímý vztah autofagie k buněčné smrti zůstává prozatím stále kontroverzní. Předpokládá se, že hlavním a nejdůležitějším činitelem zodpovědným za proteolytický rozklad buňky při autofagii jsou kathepsíny. Výzkum autofagie ukázal, že regulace tvorby autofagosomu, jež vyústí v autofagickou buněčnou smrt, je do značné míry komplexní (Xie a Klionsky, 2007). Savčí homolog kvasinkového genu *Atg6,* známý jako Beclin 1, je důležitým faktorem ovlivňujícím tvorbu autofagosomu, ovšem pouze za předpokladu, že tvoří komplex s kinasou PI3KC3 (phosphatidylinositol 3-kinase, class 3; Kihara et al., 2001). K potlačení autofagické buněčné smrti vede naopak přímá interakce Beclinu 1 s antiapoptotickými Bcl-2 proteiny (Pattingre et al., 2005). Protein *Atg5* zase přispívá k autofagii prostřednictvím interakce s adaptotovým proteinem FADD (Pyo et al., 2005). Významnou úlohu při regulaci autofagie mohou mít také ceramidy, jejichž stimulace vede ke zvýšené expresi Beclinu 1 (Scarlatti et al., 2004) a rovněž mitochondriálního proteinu BNIP3, který je teprve nedávno popsaným proapoptotickým zástupcem rodiny Bcl-2 (Daido et al., 2004; Hengartner, 2000). Beclin 1 protein může také plnit funkci nádorového supresoru, neboť bylo prokázáno, že jeho vysoká exprese potlačuje vývoj některých nádorů v ranném stadiu (Liang et al., 1999; Yue et al., 2003). Dalším důležitým regulátorem autofagie je kinasa mTOR, jejíž inhibice je jedním z prvotních impulsů tvorby autofagosomu (Petiot et al., 2000; Arico et al., 2001). Mezi typické znaky autofagické vakuolizace patří také redistribuce fúzního

proteinu LC3-GFP (light chain 3 - green fluorescence protein) do autofagosomů nebo autolysozomů (Klionsky et al., 2008). Dosavadní získané znalosti o vztahu autofagie k buněčné smrti však neposkytují jednoznačné důkazy o tom, zda autofagie představuje nezávislý typ programované buněčné smrti nebo pouze jakýsi záložní mechanismus tam, kde je inhibována apoptóza nebo je jednoduše odpovědí poškozené buňky na stresový podnět (Maiuri et al., 2007).

Navzdory výše uvedenému neexistují pochybnosti o tom, že autofagie podporuje buněčné přežití v mnoha různých fyziologických a experimentálních systémech (Neufeld a Baehrecke, 2008). Například buňky v pokročilém stádiu autofagie mohou regenerovat *in vitro* po přenesení do standardních podmínek (Boya et al., 2005). Je také známo, že v řadě sytémů, v nichž je autofagie potlačena genetickou inaktivací *atg* genů, nedochází k zabránění buněčné smrti, ale naopak k její akceleraci (Galluzzi et al., 2008). Tato fakta poukazují na zásadnější význam autofagie pro přežití, než její spoluúčast na procesu buněčné smrti.

5 Cíle dizertační práce

1. Zjistit, zda inhibitory serinových proteas TPCK a TLCK pouze modifikují program buněčné smrti nebo poskytují skutečnou ochranu před smrtí buňkám, u nichž je indukována apoptóza.

2. Objasnit mechanismy inhibičního působení TPCK a TLCK na aktivitu kaspasových proteas.

3. Nalézt možné cíle cytotoxického účinku TPCK a TLCK na buněčné a molekulární úrovni.

6 Metodické postupy

V této kapitole budou uvedeny experimentální postupy, které jsem využil v rámci předkládaných prací a dále metodiky použité při získávání dosud nepublikovaných výsledků. Metodické postupy uvedené v publikacích bez vysvětlení budou popsány v plném znění.

Kultivace buněk

Suspenzní buněčné linie HL-60, U937 a K562 (Tab. 2) byly kultivovány ve standardním médiu RPMI-1640 obohaceném o 10% fetální hovězí sérum (FBS) a antibiotika (penicilin - 100 U/ml; streptomycin - 100 µg/ml) v atmosféře 5 % CO_2 při 37 °C. Hustota buněčné suspenze byla udržována v rozmezí 5 x 10^4 až 6 x 10^5 na ml. Ke stanovení hustoty buněk byl využíván elektronický čítač částic *Vi*-Cell (Beckman Coulter, USA). Všechny buněčné linie byly zakoupeny od ECACC (European Collection of Cell Cultures, Velká Británie).

Tab. 2. Charakteristika buněčných linií

Buněčná linie	Typ onemocnění	Tkáňový původ	Reference
K562	chronická myeloidní leukémie	lidská krev	Andersson et al., 1979
HL-60	promyelocytární leukémie	lidská krev	Collins et al., 1977
U937	histiocytický lymfom	lidské plíce	Anderson a Abraham, 1980

Stanovení buněčné proliferace a viability

Ke stanovení buněčné proliferace a viability byl využit standardní MTT tetrazoliový test zavedený Mosmannem (Mosmann, 1983), který jsme mírně modifikovali (Frydrych et al., 2008; Frydrych a Mlejnek, 2008a).

Morfologická analýza buněčné smrti

Sedimenty buněk promyté v PBS (phosphate buffer saline; fyziologický roztok) byly fixovány v ledové směsi methanolu s kyselinou octovou (3:1) po dobu minimálně 2 h. Fixované buňky byly sedimentovány centrifugací (2 000 rpm, 5 min., laboratorní

teplota) a resuspendovány v barvící směsi Hoechstu 33342 (2 μg/ml) v PBS. Alikvoty nabarvených buněk byly naneseny na podložní skla a morfologie byla pozorována fluorescenčním mikroskopem Olympus BX 50 (Olympus, Německo) a zaznamenána kamerou Olympus DP 50 (Olympus, Německo).

Měření integrity cytoplazmatické membrány (viability)

Buněčná suspenze byla smíchána v poměru 1:1 s roztokem trypanové modři (0,4%, w/v) v PBS. Princip metody spočívá v obarvení buněk s porušenou cytoplazmatickou membránu, které jsou považovány za mrtvé, zatímco buňky s intaktní membránou se nebarví a jsou považovány za živé. Hodnocení probíhalo pomocí elektronického přístroje *Vi*-Cell (Beckman Coulter, USA).

Stanovení intracelulárního obsahu ATP

Obsah ATP v buněčných extraktech byl stanoven pomocí ATP-bioluminiscenčního kitu od firmy Sigma-Aldrich (Frydrych a Mlejnek, 2008a).

Analýza fragmentace DNA

Suspenze obsahující 5 x 10^6 buněk byla centrifugována (1 500 rpm, 5 min., laboratorní teplota) a sediment buněk byl po promytí v PBS lyzován v DNA lyzačním pufru (50mM Tris/HCl, pH 8,0, 10mM EDTA, 0,5% lauryl sarkosin sodný a 0,5 mg/ml proteinasy K) přes noc při 37 °C. Poté byly vzorky inkubovány v přítomnosti RNasy A (0,2 mg/ml) zbavené DNasy po dobu 3 h při 37 °C. Takto připravené extrakty byly naneseny na agarosový gel (1,8%) obsahující ethidium bromid (0,5 μg/ml) a podrobeny přibližně 12-ti hodinové elektroforetické separaci při konstantním napětí 25 V. Fotografie gelu byla pořízena pomocí dokumentačního systému AlphaDigiDoc (Alpha Innotech, USA).

Měření kaspasové aktivity v buněčných extraktech

Enzymatická aktivita kaspasových proteas byla měřena v cytoplazmatických extraktech pomocí umělých fluorescenčních substrátů. Detailní postup je uveden v publikaci Frydrych a Mlejnek, 2008a.

Měření enzymatické aktivity rekombinantních kaspas

Enzymatická aktivita lidských rekombinantních kaspas byla měřena podle protokolů doporučených výrobci s využitím fluorescenčních substrátů (Frydrych a Mlejnek, 2008a).

Westernův přenos

Analýza exprese proteinů byla provedena pomocí Westernova přenosu s využitím standardních procedur. Detaily týkající se použitých protilátek a detekčního systému jsou uvedeny v publikacích (Frydrych a Mlejnek, 2008b; Frydrych et al., 2008).

Měření respirace intaktních buněk

Spotřeba kyslíku (respirační aktivita) intaktních buněk v růstovém médiu obsahujícím 4mM glukózu jako substrát, byla měřena Clarkovou kyslíkovou elektrodou (Frydrych et al., 2008).

Stanovení mitochondriálního transmembránového potenciálu (ΔΨ)

Ke stanovení ΔΨ byly využity fluorescenční sondy TMRE (tetramethylrhodamin ethyl ester perchlorát, resp. $DiOC_6(3)$ (3,3′-dihexyloxacarbocyanin iodide)). Detailní postup je uveden v publikacích (Frydrych et al., 2008; Frydrych a Mlejnek, 2008a).

Měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS)

Intracelulární produkce ROS byla měřena pomocí fluorescenční sondy 2',7'-dichlorofluorescein diacetátu (DCFDA; Bass et al., 1983). K buněčné suspenzi (3×10^5/ml) v růstovém médiu byl přidán DCFDA (výsledná koncentrace 10 μM) a směs byla inkubována 20 min. při standardních kultivačních podmínkách. Intenzita fluorescence úměrná množství ROS byla stanovena pomocí průtokové cytometrie (Cytomics FC 500 Systém; Beckman Coulter, USA) při 488/525 (excitace/emise) nm. V každém vzorku bylo analyzováno nejméně 15 000 buněk.

Měření intracelulární koncentrace vápníku (Ca^{2+})

K měření intracelulární koncentrace Ca^{2+} byla využita fluorescenční sonda Calcium green-1/acetoxymethyl ester (calcium green-1/AM; Lee et al., 1999). K buněčné suspenzi (3 x 10^5/ml) v růstovém médiu byl přidán calcium green-1/AM (výsledná koncentrace 1μM). Buňky byly inkubovány 20 min. při standardních kultivačních podmínkách, a poté sedimentovány centrifugací (1 500 rpm, 5 min., laboratorní teplota). Supernatant byl odstraněn a buněčný pelet resuspendován ve stejném objemu PBS. Intenzita fluorescence úměrná obsahu Ca^{2+} byla stanovena pomocí průtokové cytometrie (Cytomics FC 500 Systém; Beckman Coulter, USA) při 488/525 (excitace/emise) nm. V každém vzorku bylo analyzováno nejméně 15 000 buněk.

Statistická analýza

Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. Statistická významnost odchylek od průměrné hodnoty byla zjištěna Studentovým *t*-testem. Hodnoty $P < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

7 Komentář k předloženému souboru prací

7.1 Modulace buněčné smrti inhibitory serinových proteas u leukemických buněčných linií

Frydrych I, Mlejnek P. 2008. Serine protease inhibitors N-alpha-Tosyl-L-Lysinyl-Chloromethylketone (TLCK) and N-Tosyl-L-Phenylalaninyl-Chloromethylketone (TPCK) are potent inhibitors of activated caspase proteases. *Journal of Cellular Biochemistry* **103**: 1646-1656.

Frydrych I, Mlejnek, P. 2008. Serine protease inhibitors N-α-Tosyl-L-Lysinyl-Chloromethylketone (TLCK) and N-Tosyl-L-Phenylalaninyl-Chloromethylketone (TPCK) do not inhibit caspase-3 and caspase-7 processing in cells exposed to pro-apoptotic inducing stimuli. *Journal of Cellular Biochemistry* **105**: 1501-1506.

Frydrych I, Mlejnek P. N-α-tosyl-L-lysil-chloromethylketone (TLCK) inhibits many apoptotic features in dying K562 cells but it does not prevent cells from death. SSCT & ETS Joint Conference "Chemicals, Human & Enviroment", Grinda, Sweden, September 7-9, 2006; poster.

V této kapitole předkládám dvě původní práce uveřejněné v časopise Journal of cellular biochemistry, které obsahují výsledky experimentů vykonaných na Ústavu biologie LF UP. Poslední odkaz se týká nepublikovaných výsledků, které byly prezentovány formou posteru na mezinárodní konferenci. Obě práce i poster se zaměřují na problematiku modulace buněčné smrti inhibitory serinových proteas a v plném znění jsou zahrnuty v závěru této kapitoly.

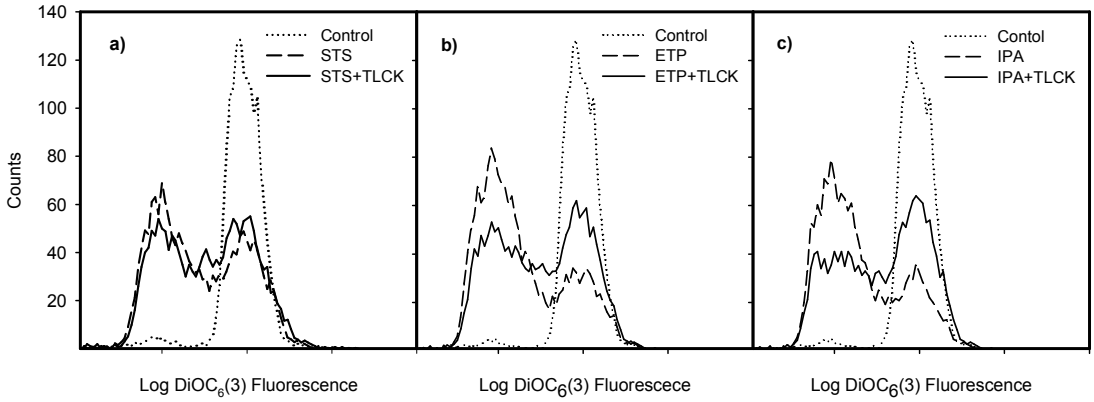
Inhibitory serinových proteas TPCK a TLCK projevují mnohočetné biochemické účinky na savčí buňky. Patrně nejvíce rozporuplné výsledky v literatuře se týkají vlivu těchto látek na modulaci apoptózy. Určitá skupina autorů ukazuje, že inhibitory serinových proteas potlačují některé morfologické a biochemické znaky apoptózy (Bruno et al., 1992; Weaver et al., 1993; Shimizu a Pommier, 1997) nebo jsou schopny prostřednictvím inhibice aktivace kaspasových proteas apoptózu dokonce zcela

potlačit (Jones et al., 1998; Stefanis et al., 1997; Dong et al., 2000). Vedle výše zmíněných efektů publikuje jiná skupina autorů data o tom, že TLCK a především TPCK samy o sobě indukují buněčnou smrt (Wu et al., 1996; Drexler et al., 1997; Murn et al., 2004; Mlejnek, 2005) nebo přinejmenším zesilují cytotoxické účinky jiných látek (King et al., 2004; Okada et al., 2004). Proto jsme se rozhodli do této problematiky vstoupit s cíli: i) zhodnotit, nakolik jsou inhibitory serinových proteas schopny ochránit buňky před smrtí a ii) pokusit se objasnit sporné výsledky v literatuře týkající se modulačních účinků TPCK a TLCK na aktivaci kaspasových proteas v buňkách vystavených cytotoxickému podnětu.

Pro naše experimenty jsme zvolily tři modelové cytotoxické látky – etoposid (ETP), N^6-isopentenyladenosin (IPA) a staurosporin (STS), jejichž mechanismy indukce buněčné smrti jsou dobře popsány. Tyto látky indukují u buněk apoptózu s typickými morfologickými a biochemickými projevy (van Maanen et al., 1988; Mlejnek a Dolezel, 2005; Tamaoki et al., 1986). Cytotoxické účinky výše zmíněných látek jsme modulovali TPCK a TLCK. Ve shodě s jinými autory jsme zjistili, že oba inhibitory potlačují nukleosomální fragmentaci genomové DNA, což může být v jistém kontextu chápáno jako protektivní účinek (Frydrych a Mlejnek, 2008a). Tento výsledek zároveň ukazuje na možnou inhibici aktivace výkonných kaspas působením TPCK a TLCK, neboť je známo, že výkonné kaspasy jsou schopny v průběhu apoptózy aktivovat DNasy (Porter a Jänicke, 1999; Inohara et al., 1999). Inhibice nukleosomální fragmentace DNA účinkem TPCK a TLCK však neposkytuje buňkám skutečnou ochranu před smrtí, navíc je tento projev apoptózy poměrně pozdní událostí celého procesu (Collins et al., 1997).

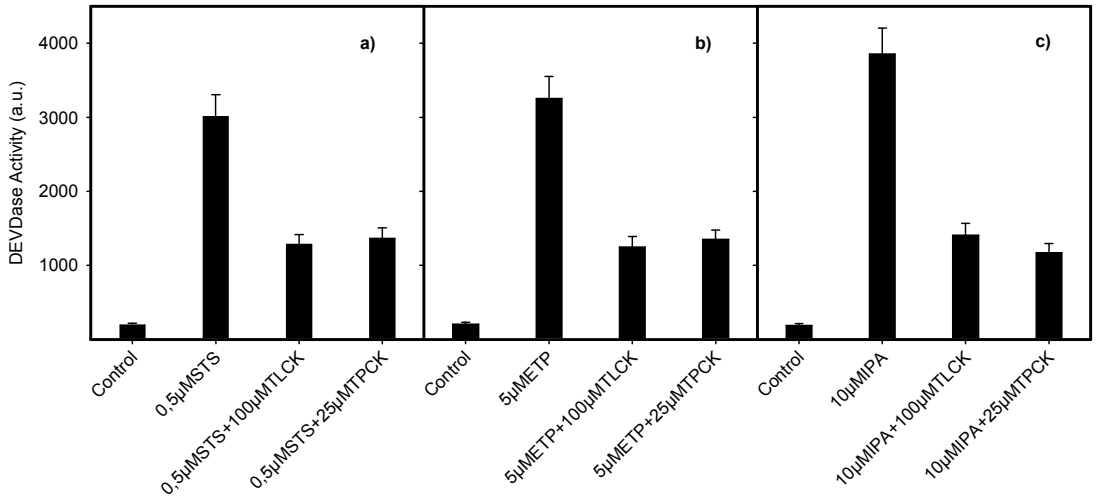
Další naše výsledky svědčící pro možné protektivní působení inhibitorů serinových proteas se týkají měření mitochondriálního transmembránového potenciálu ($\Delta\Psi$), který má úzkou souvislost s procesem buněčné smrti. Disipace $\Delta\Psi$ obvykle indikuje nefunkčnost mitochondrií a bývá často důsledkem otevření PTP, což je stav, který vede v závislosti na dalších okolnostech k apoptotické nebo nekrotické buněčné smrti (Green a Kroemer, 2004). Zjistili jsme, že TLCK redukuje disipaci transmembránového potenciálu v buňkách ovlivněných ETP nebo IPA, nikoliv však STS (Obr. 21). Důvodem může být skutečnost, že buněčná smrt indukovaná staurosporinem zahrnuje také aktivaci nekaspasových proteas (Johansson

et al., 2003). Po působení TPCK došlo naopak k urychlení disipace ΔΨ v buňkách ovlivněných ETP, IPA i STS (Frydrych a Mlejnek, 2008a). Vzhledem k tomu, že disipace ΔΨ je obvykle považována za jedno z možných kriterií identifikace buněčné smrti, mohou být inihibiční účinky TLCK na disipaci ΔΨ u buněk ovlivněných ETP nebo IPA chápány také jako protektivní.



Obr. 21. Vliv TLCK na mitochondriální transmembránový potenciál (ΔΨ) u buněk HL-60. Buňky byly inkubovány 18 h v růstovém médiu obsahujícím 0,5μM STS (**panel a**), 5μM ETP (**panel b**) nebo 10μM IPA (**panel c**) v kombinaci s 100μM TLCK, jak je naznačeno. Velikost transmembránového potenciálu byla stanovena pomocí průtokové cytometrie podle postupu uvedeného v metodách (Frydrych a Mlejnek, 2008a). Jako kontrola byly použity buňky rostoucí v médiu bez cytotoxické látky, resp. TLCK. Obrázky představují typické histogramy.

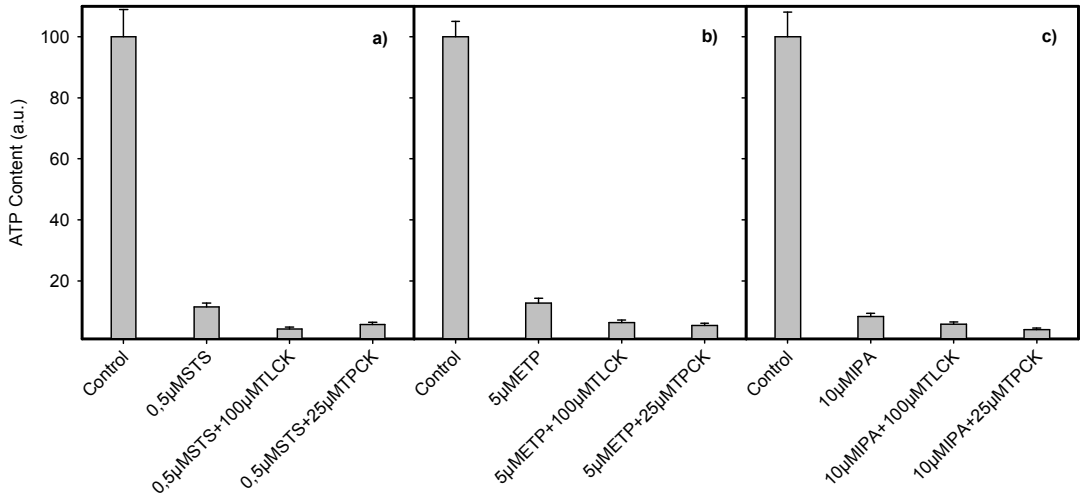
Podobně jako jiní autoři jsme pozorovali, že TPCK a TLCK výrazně redukují enzymovou aktivitu výkonných kaspas-3, -7 (Obr. 22) a -6 (Frydrych a Mlejnek, 2008a) v buňkách vystavených cytotoxickému působení IPA, ETP nebo STS. Vzhledem k tomu, že inhibice aktivace kaspas může být zároveň projevem inhibice apoptózy, lze inhibiční efekt TPCK a TLCK považovat z jistého pohledu za protektivní, ovšem pouze za předpokladu, že není aktivován jiný buněčný program smrti nezávislý na aktivaci kaspas.



Obr. 22. Vliv TPCK a TLCK na aktivaci kaspasových proteas (kaspasa-3/-7) u buněčné linie HL-60. Buňky byly inkubovány 18 h v růstovém médiu obsahujícím 0,5μM STS (**panel a**), 5μM ETP (**panel b**) nebo 10μM IPA (**panel c**) v kombinaci s TLCK (100μM) nebo TPCK (25μM). Aktivita kaspasy-3/-7 (DEVDasová aktivita) byla měřena pomocí fluorescenčního syntetického substrátu (Frydrych a Mlejnek, 2008a). Kontrola představuje DEVDasovou aktivitu v neovlivněných buňkách. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní odchylkou.

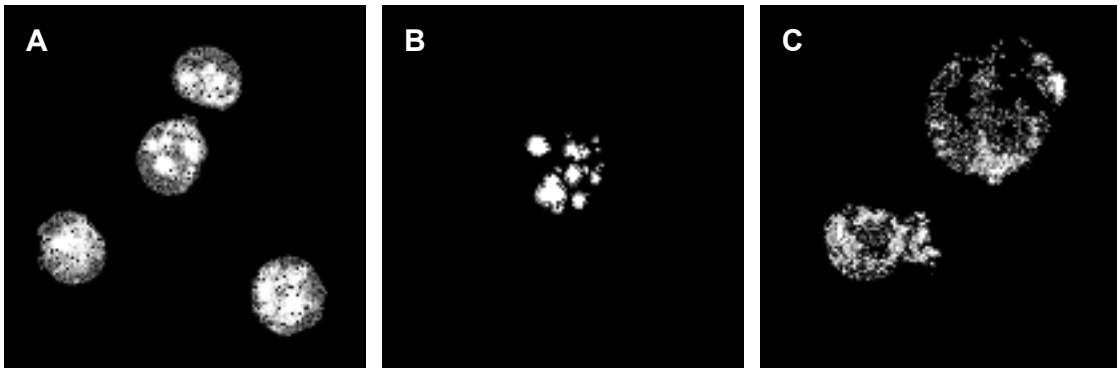
Podobné účinky TLCK, které by mohly být považovány za protektivní, jsme pozorovali také v jiných experimentálních systémech. U leukemické buněčné linie K562, která byla vystavena působení imatinibu (STI 571; specifický inhibitor Bcr-Abl tyrosin kinasy), vedla aplikace TLCK k redukci disipace transmembránového potenciálu a inhibici aktivace kaspasy-3 (viz poster Frydrych a Mlejnek, 2006).

Všechny pozorované účinky inhibitorů serinových proteas, jako je inhibice endonukleas, inhibice kaspasových proteas a zpomalení disipace transmembránového potenciálu, mohou být chápány jako protektivní. Ukázalo se však, že tyto jevy zřejmě se skutečnou protekcí nesouvisí, neboť TPCK ani TLCK neposkytují buňkám ochranu z hlediska dlouhodobého přežití. Měřením některých parametrů souvisejících s buněčnou proliferací a viabilitou jako je MTT tetrazoliový test nebo biosyntéza ATP s dostatečným časovým odstupem, jsme jednoznačně prokázali, že aplikace inhibitorů serinových proteas nevede k inhibici buněčné smrti. Výsledky MTT testu ukázaly, že TPCK i TLCK dokonce snižují redukci tetrazoliových solí v buňkách ovlivněných ETP, IPA nebo STS (Frydrych a Mlejnek, 2008a). Podobný efekt byl pozorován také při analýze produkce ATP (Obr. 23).



Obr. 23. Vliv TLCK a TPCK na produkci ATP u buněk HL-60. Buňky byly inkubovány v růstovém médiu obsahujícím 0,5μM STS (**panel a**), 5μM ETP (**panel b**) nebo 10μM IPA (**panel c**) v kombinaci s TLCK (100μM) nebo TPCK (25μM), jak je naznačeno. Po 18 h byly promyté buňky přeneseny do čerstvého média bez přítomnosti toxické látky či inhibitoru serinových proteas a inkubovány dalších 24 h při standardních podmínkách. Po uplynutí této doby byl z buněk připraven lyzát a obsah ATP stanoven pomocí bioluminometrie. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní odchylkou. Jako kontrola byly použity neovlivněné buňky (100 % obsahu ATP).

Na základě morfologické analýzy buněk inkubovaných 48 h v růstovém médiu obsahujícím ETP nebo IPA v kombinaci s inhibitory serinových proteas jsme zjistili, že typicky apoptotická morfologie indukovaná ETP nebo IPA se aplikací TPCK nebo TLCK mění na morfologii spíše nekrotickou (není ukázáno). Stejnou změnu morfologie lze pozorovat i v případě působení imatinibu, resp. imatinibu v kombinaci s TLCK u buněk K562 (Obr. 24).



Obr. 24. Vliv TLCK na morfologii K562 buněk vystavených působení imatinibu. Buňky byly inkubovány v růstovém médiu obsahujícím 0,5μM imatinib (**B**) nebo imatinib v kombinaci s 100μM TLCK (**C**). Buněčná morfologie byla analyzována fluorescenční mikroskopií (viz. metodické postupy). Kontrolu představují neovlivněné buňky (**A**).

Z našich výsledků jednoznačně vyplývá, že pozorované protektivní účinky inhibitorů serinových proteas TPCK a TLCK jsou pouze zdánlivé a neposkytují leukemickým buňkám HL-60 a K562 dlouhodobou ochranu před smrtí. Buňky vystavené stimulu buněčné smrti umírají v přítomnosti inhibitorů serinových proteas ve stejné nebo dokonce vyšší četnosti, avšak charakter buněčné smrti se mění z apoptózy spíše na nekrózu.

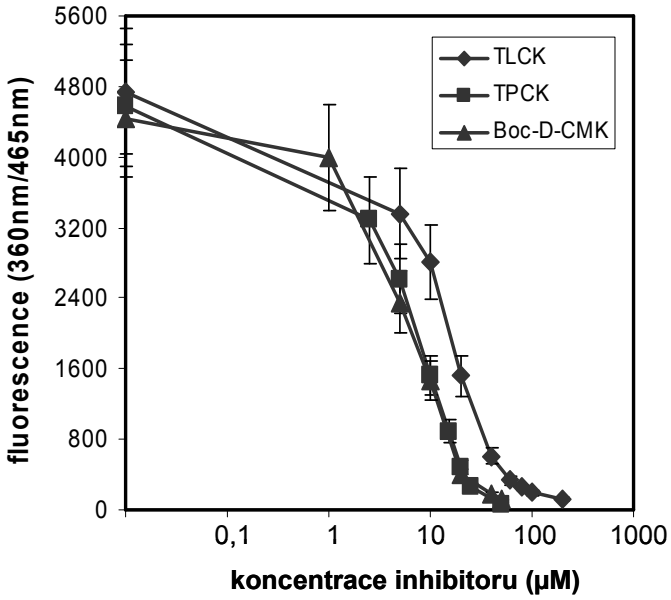
Na základě výše uvedeného se přikláníme ke skupině autorů, kteří uvádí, že tyto látky nevykazují žádné cytoprotektivní účinky a jsou spíše cytotoxické samy o sobě.

V další fázi jsme se zaměřili na podrobnější analýzu inhibice kaspasových proteas, k níž může docházet v zásadě několika způsoby: i) inhibicí aktivace kaspas, ii) přímou inhibicí již aktivovaných kaspas nebo iii) kombinací obou výše uvedených jevů.

Pozn.: Pro lepší orientaci zde předesílám, že v tomto textu se pod pojmem „aktivita" rozumí enzymatická aktivita kaspasy, zatímco termín „aktivace" (maturace, processing) vyjadřuje přeměnu neaktivní (prekurzorové) formy kaspasy na aktivní.

Jak bylo výše uvedeno, zjistili jsme, že TPCK a TLCK potlačují DEVDasovou (kaspasa-3 a -7; Obr. 22) a VEIDasovou (kaspasa-6; Frydrych a Mlejnek, 2008a) aktivitu u HL-60 buněk vystavených cytotoxickému působení STS, ETP nebo IPA. Podobné výsledky jsou obvykle interpretovány jako inhibice aktivace kaspas, což je v literatuře dokumentováno řadou prací (Stefanis et al., 1997; Jones et al., 1998; Dong et al., 2000). Možnost přímé inhibice aktivovaných výkonných kaspas TPCK a TLCK byla do značné míry přehlížena, navzdory faktu, že oba inhibitory jsou schopny kromě serinových proteas inhibovat také proteasy cysteinového typu, jako např. papain nebo bromelain (Drenth et al., 1976; Jia et al., 1995). Měření aktivity výkonných kaspas v extraktech připravených z buněk ovlivněných cytotoxickým agens a současně TLCK nebo TPCK (Obr. 22) však neposkytuje žádný důkaz o mechanismu inhibice kaspas. Proto jsme studovali inhibiční vliv TPCK a TLCK na aktivitu výkonných kaspas také v extraktech připravených z apoptotických buněk po působení samotných cytotoxických látek. V tomto případě byly inhibitory aplikovány přímo do lyzátů s aktivovanými kaspasami a opět byla pozorována výrazná redukce aktivity výkonných kaspas

(Frydrych a Mlejnek, 2008a). Tyto výsledky naznačily, že TPCK a TLCK mohou působit také jako přímé inhibitory již aktivovaných kaspas. Abychom potvrdili naši hypotézu, provedli jsme inhibiční studie na lidských rekombinantních kaspasách (kaspasa-1, -3, -6 a -7). Výsledky těchto experimentů jednoznačně prokázaly interakci TPCK a TLCK s aktivními formami rekombinantních kaspas a potvrdily tak naši hypotézu, že TPCK a TLCK přímo inhibují již aktivované kaspasy. Inhibiční vliv TLCK a TPCK na aktivitu rekombinantní kaspasy-3 dokumentuje Obr. 25. Obdobných výsledků jsme dosáhli také měřením aktivity kaspasy-6 a -7 (Frydrych a Mlejnek, 2008a). Pozorovaná inhibice kaspasy-1 účinkem TLCK byla nejméně výrazná (poster Frydrych a Mlejnek, 2006).



Obr. 25. Inhibiční vliv TPCK, TLCK a Boc-D-CMK na enzymatickou aktivitu rekombinantní aktivní kaspasy-3. Pro měření enzymatické aktivity byla využita lidská rekombinantní kaspasa-3 a její specifický fluorescenční substrát (detaily uvedeny v Frydrych a Mlejnek, 2008a). Aktivita kaspasy-3 byla modulována TLCK (5–200μM), TCPK (2,5–50μM) nebo Boc-D-CMK (1–50μM), jak je naznačeno. Kontrolu reprezentuje kaspasová aktivita naměřená v nepřítomnosti inhibitoru. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní odchylkou.

Z výsledků měření inhibice rekombinantních kaspas lze usuzovat, že TPCK a TLCK působí jako účinné, avšak neselektivní inhibitory aktivovaných kaspas-3, -6 a -7. TPCK vykazuje v porovnání s TLCK výraznější inhibiční účinek vůči všem studovaným kaspasám, který je dokonce srovnatelný s působením nespecifického

kaspasového inhibitoru Boc-D-CMK (*t*-butoxy karbonyl-aspartát-chloromethylketon; Frydrych a Mlejnek, 2008a; Tab. 3).

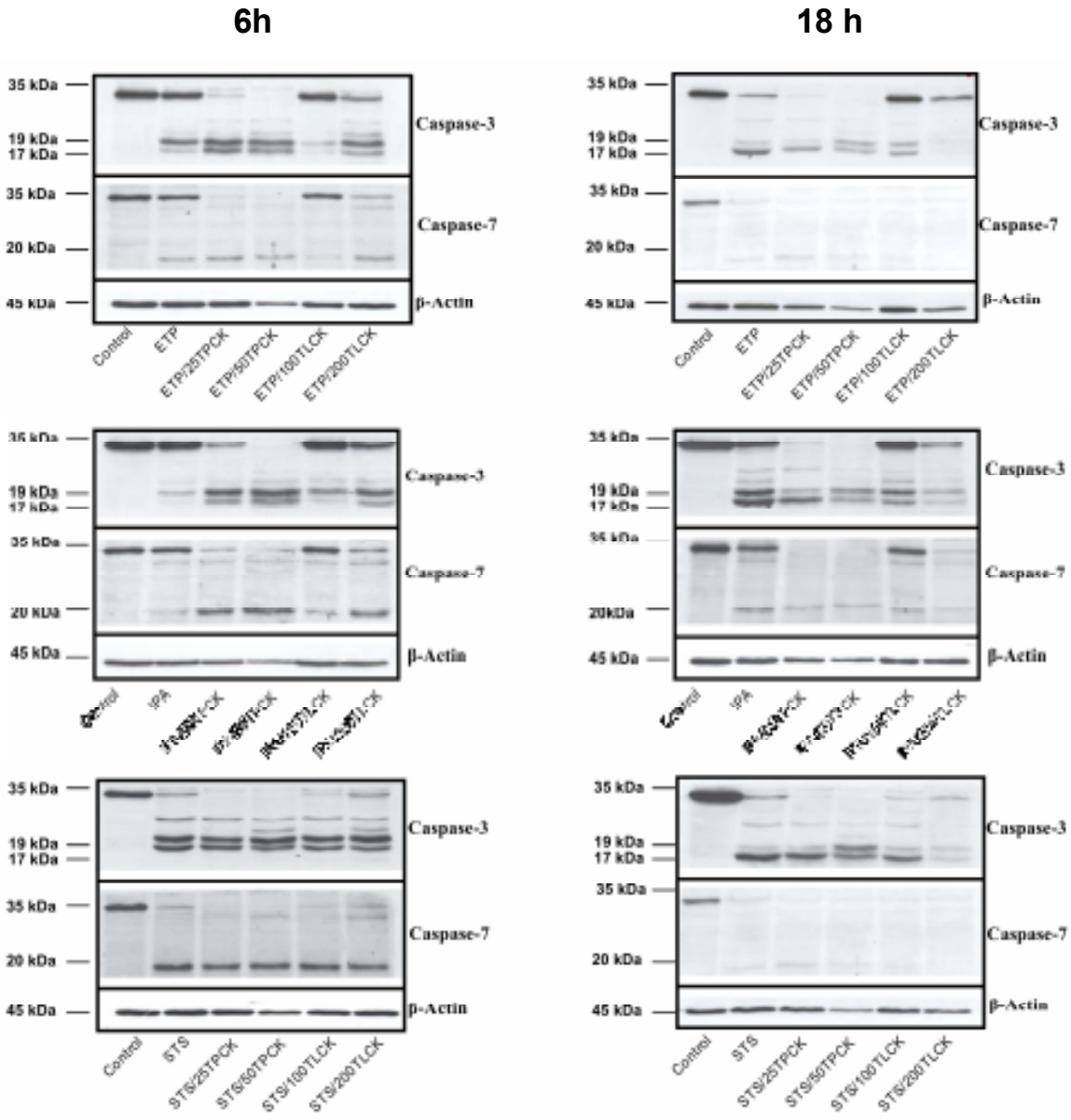
Tab. 3. Inhibiční účinky TPCK, TLCK a Boc-D-CMK na enzymatickou aktivitu lidských rekombinantních kaspas.

Inhibitor	IC_{50} (kaspasa-3) (μM)	IC_{50} (kaspasa-6) (μM)	IC_{50} (kaspasa-7) (μM)
TLCK	12,0	54,5	19,3
TPCK	6,9	17,5	2,7
Boc-D-CMK	6,0	20,2	4,1

Naše zcela originální výsledky ukázaly, že zdánlivé protektivní účinky TPCK a TLCK na proces apoptózy je možné vysvětlit jejich působením jako přímých inhibitorů aktivovaných výkonných kaspas.

Tento závěr je sice odlišný od závěru jiných autorů (Stefanis et al., 1997; Jones et al., 1998), avšak žádný z nich nestudoval inhibiční vliv TPCK a TLCK na aktivované výkonné kaspasy. Naše výsledky jsou naopak v souladu s dřívějšími nálezy ukazujícími na možnou interakci inhibitorů serinových proteas s proteasami cysteinového typu (Drenth et al., 1976; Jia et al., 1995).

Jak bylo výše uvedeno, může být snížení enzymové aktivity výkonných kaspas také výsledkem inhibice aktivace kaspas a zároveň přímé inhibice již aktivovaných kaspas. Proto jsme dále zkoumali vliv TPCK a TLCK na samotnou aktivaci kaspasy-3 a -7 v HL-60 buňkách vystavených účinku ETP, STS nebo IPA. Aktivaci kaspas jsme analyzovali pomocí western-blotu s využitím protilátek rozeznávajících jak prekurzorovou, tak i aktivní formu enzymu. Výsledky jednoznačně prokázaly, že TPCK nemá žádný vliv na aktivaci kaspasy-3 a -7 v buňkách ovlivněných STS, ETP nebo IPA. Aplikace TPCK naopak dokonce podporuje aktivaci kaspas indukovanou samotnými cytotoxickými látkami (Obr. 26). Nižší koncentrace TLCK (100μM) pouze minimálně inhibovala aktivaci kaspasy-3 a -7 po působení ETP nebo IPA, zatímco vyšší koncentrace (200μM) neměla žádný vliv na aktivaci (Obr. 26).



Obr. 26. Vliv TPCK a TLCK na aktivaci kaspasy-3 a -7 po indukci apoptózy ETP, IPA nebo STS u buněk HL-60. Buňky byly inkubovány v přítomnosti TPCK (25 a 50μM) nebo TLCK (100 a 200μM) v kombinaci s cytotoxickým agens (ETP–horní panely; IPA–prostřední panely; STS–dolní panely). Aktivace kaspasy-3 a -7 byla analyzována western-blotem 6 h (levé panely) a 18 h (pravé panely) po přidání látek do růstového média. Kontrola reprezentuje neovlivněné buňky. Množství nanášených proteinů bylo normalizováno na aktin. Obrázky reprezentují typické výsledky.

Z výsledků western-blotové analýzy vyplývá, že pozorovanou inhibici enzymové aktivity kaspasy-3 a -7 (DEVDasové aktivity) inhibitory serinových proteas TPCK a TLCK nelze vysvětlit inhibičním působením těchto látek na samotnou aktivaci kaspasy-3 a -7 v HL-60 buňkách ovlivněných ETP, IPA nebo STS.

Závěr:

1. Inhibitory serinových proteas TPCK a TLCK potlačují některé morfologické a biochemické projevy apoptózy jako je kondenzace chromatinu, nukleosomální fragmentace DNA, aktivace výkonných kaspas a disipace transmembránového potenciálu u buněk vystavených stimulům apoptotické buněčné smrti.

2. TPCK a TLCK neposkytují buňkám skutečnou ochranu před smrtí, avšak mění charakter buněčné smrti z apoptotického spíše na nekrotický.

3. TPCK a TLCK působí jako přímé inhibitory již aktivovaných výkonných kaspas.

4. Vliv TPCK a TLCK na aktivaci výkonných kaspas je pouze minimální nebo žádný.

7.2 Možné mechanismy cytotoxického účinku TPCK a TLCK u leukemických buněčných linií

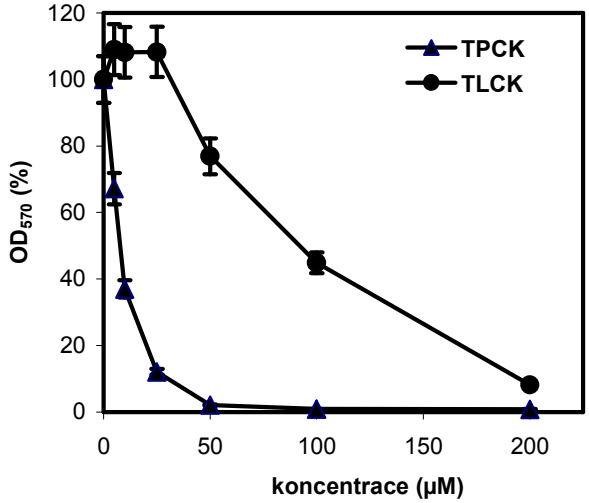
Frydrych I, Mlejnek P, Dolezel P, Zoumpourlis V, Krumpochova P. 2008. The broad-spectrum caspase inhibitor Boc-Asp-CMK induces cell death in human leukaemia cells. *Toxicology In Vitro* **22**: 1356-1360.

Frydrych I, Krumpochova P, Dolezel P, Mlejnek P. Serine protease inhibitors N-α-tosyl-L-lysinyl-chloromethylketone (TLCK) and N-tosyl-L-phenylalaninyl chloromethylketone (TPCK) exhibit adverse effects on mitochondrial function. The 15th International Congress on In Vitro Toxicology, Djurönäset, Stockholm Archipelago, Sweden, September 25-28, 2008; poster.

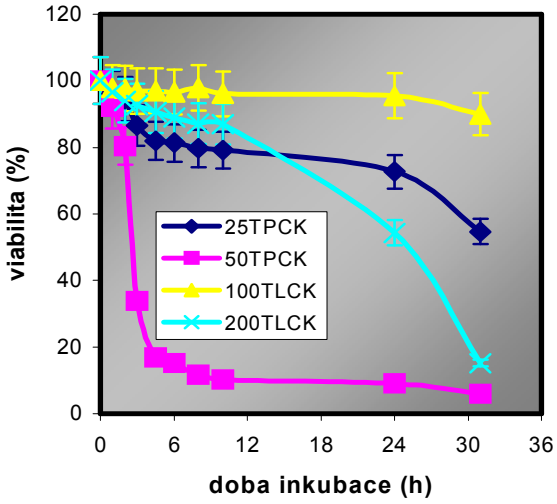
Tato kapitola obsahuje převážně dosud nepublikované výsledky týkající se cytoxických účinků TPCK a TLCK s nastíněním možného mechanismu jejich působení (Frydrych et al., posterové sdělení), které jsou konfrontovány s již publikovanými výsledky působení nespecifického kaspasového inhibitoru Boc-D-CMK (Frydrych et al., 2008). Výše uvedená publikace a rovněž posterové sdělení uzavírají tuto kapitolu.

V literatuře se dlouhodobě spekuluje o vlivu TPCK a TLCK na indukci buněčné smrti. Řada prací ukazuje, že inhibitory serinových proteas indukují buněčnou smrt samy o sobě nebo minimálně zesilují cytotoxické účinky jiných látek (Wu et al., 1996; Drexler et al., 1997; Murn et al., 2004; Mlejnek, 2005). Tyto výsledky jsou však v ostrém rozporu s protektivními účinky těchto látek pozorovanými jinou skupinou autorů (Bruno et al., 1992; Weaver et al., 1993; Shimizu a Pommier, 1997). Nutno podotknout, že z historického pohledu byly jako první rozpoznány účinky cytotoxické. Již na počátku 70. let se obě látky používaly jako protinádorová léčiva (Troll et al., 1970; Hirschorn et al., 1971; Chou et al., 1974). Na základě našich výsledků se přikláníme, podobně jako jiní autoři, spíše k názoru, že TPCK a TLCK jsou v obvykle používaných koncentracích cytotoxické samy o sobě. Zjistili jsme, že obě látky inhibují proliferaci a indukují buněčnou smrt u buněk HL-60, což je

dokumentováno standardním MTT tetrazoliovým testem (Obr. 27) a měřením permeability cytoplazmatické membrány (Obr. 28).

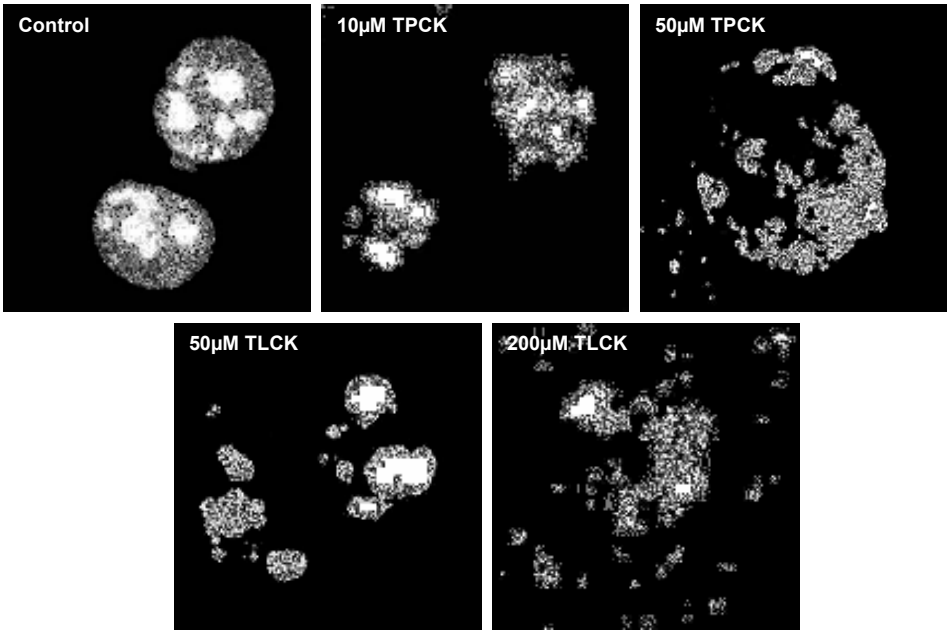


Obr. 27. Vliv TLCK a TPCK na proliferaci a viabilitu buněk HL-60 cells. Buňky byly kultivovány v růstovém médiu v přítomnosti zvyšující se koncentrace TPCK (**trojúhelníky**) nebo TLCK (**kolečka**). Po 24 h byla stanovena proliferační aktivita a viabilita buněk pomocí MTT testu (Mosmann, 1983). Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní odchylkou. Kontrolu reprezentují buňky kultivované v růstovém médiu bez přítomnosti inhibitoru (100 % OD_{570}).

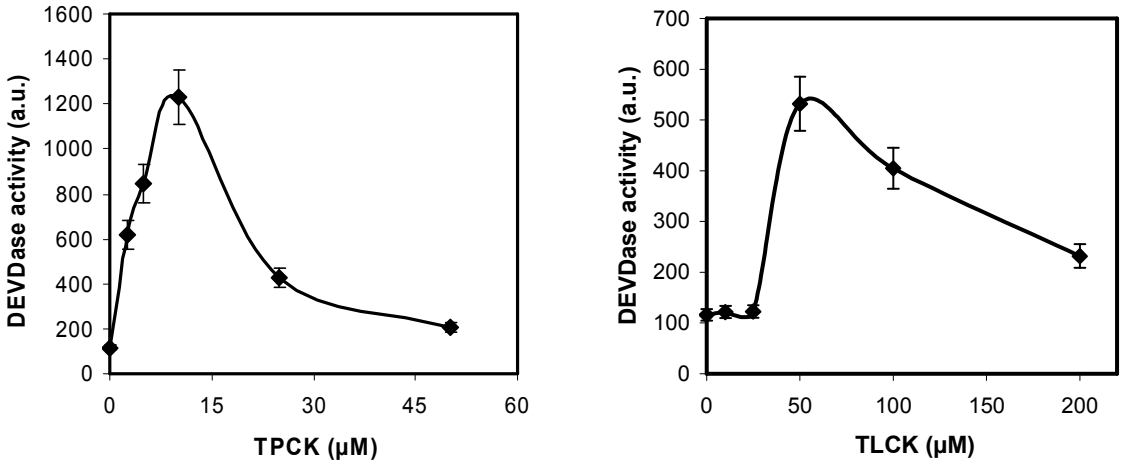


Obr. 28. Vliv TPCK a TLCK na viabilitu buněk HL-60. Buňky byly inkubovány v přítomnosti TCPK (25 a 50μM) nebo TLCK (100 a 200μM), jak je naznačeno. V různých časových intervalech byla provedena analýza buněčné smrti na základě permeability cytoplazmatické membrány (viz. metodické postupy). Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní odchylkou. Kontrolu reprezentují neovlivněné buňky.

Cytotoxické účinky TPCK a TLCK jsme prokázali také u jiných buněčných linií, jako např. U937 nebo K562 (není ukázáno). Zatímco nízké koncentrace TPCK (2-15μM) a TLCK (30-100μM) indukují buněčnou smrt s morfologickými (Obr. 29) a biochemickými (Obr. 30) znaky apoptózy, vyšší koncentrace (>30μM pro TPCK, resp. >150μM pro TLCK) mění charakter buněčné smrti spíše na nekrotický, alespoň na základě pozorovaných morfologických změn (Obr. 29). Oba typy buněčné smrti se manifestují po aplikaci TPCK v koncentracích přibližně 15–30μM a TLCK v koncentračním rozsahu 100–150 μM. Tyto výsledky nejsou překvapující vzhledem k tomu, že inhibitory serinových proteas vedle svých cytotoxických účinků také nespecificky inhibují kaspasové proteasy, přičemž inhibiční účinek TPCK je dokonce srovnatelný s účinky všeobecného kaspasového inhibitoru Boc-D-CMK (Tab. 3). Je také známo, že všeobecný kaspasový inhibitor z-VAD-fmk potlačuje u buněk apoptózu, ale zároveň zvyšuje citlivost buněk k nekrotické, eventálně autofagické buněčné smrti (Kitanaka a Kuchino, 1999; Vandenabeele et al., 2006).

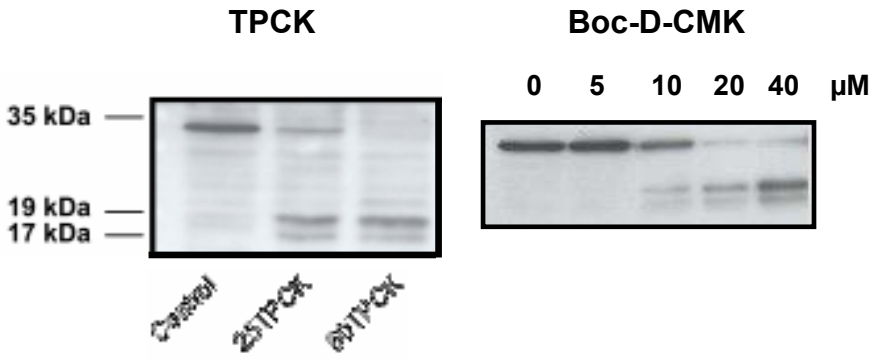


Obr. 29. Vliv TPCK a TLCK na morfologii buněk HL-60. Buňky byly inkubovány v růstovém médiu obsahujícím TPCK (10 a 50μM) nebo TLCK (50 a 200μM) po dobu 24 h. Buněčná morfologie byla hodnocena pomocí fluorescenční mikroskopie (viz. metodické postupy). Kontrolu představují buňky rostoucí v médiu bez přítomnosti TPCK nebo TLCK. Obrázky reprezentují typickou morfologii.



Obr. 30. Vliv TPCK a TLCK na aktivaci kaspasy-3/-7 u buněčné linie HL-60. Buňky byly inkubovány 18 h v růstovém médiu obsahujícím postupně se zvyšující koncentrace TPCK (**levý graf**) nebo TLCK (**pravý graf**). Aktivita kaspasy-3/-7 (DEVDasová aktivita) byla měřena pomocí fluorescenčního syntetického substrátu, jak je popsáno v Frydrych a Mlejnek, 2008a. Kontrola představuje DEVDasovou aktivitu v lyzátech z neovlivněných buněk. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní odchylkou (nepublikované výsledky).

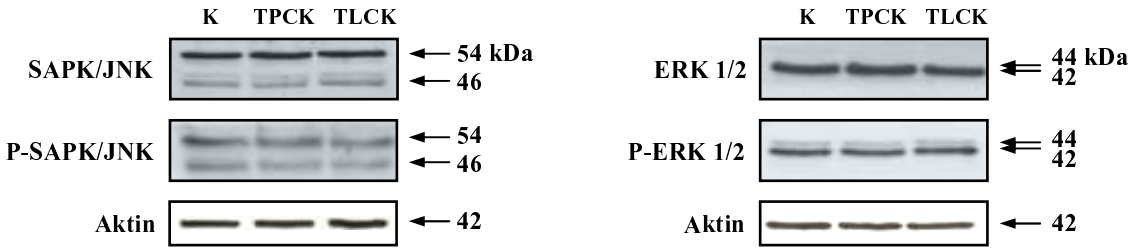
Změna apoptotického charakteru smrti indukované nízkými koncentracemi TPCK nebo TLCK na spíše nekrotický po aplikaci vyšších koncentrací, zřejmě souvisí s mírou inhibice výkonných kaspas těmito látkami (Obr. 30). Nárůst DEVDasové enzymatické aktivity po působení nízkých koncentrací TPCK (Obr. 30), které indukují typickou apoptózu, dobře koresponduje s aktivací kaspasy-3 analyzované pomocí western-blotingu (není ukázáno). Při použití vyšších koncentrací TPCK, které indukují spíše nekrózu (Obr. 29), za podmínek, kdy je DEVDasová aktivita téměř zcela potlačena (Obr. 30), však zcela překvapivě nedochází k inhibici aktivace kaspasy-3 (Obr. 31). Míra aktivace kaspasy-3 indukovaná TPCK je srovnatelná s účinky nespecifického kaspasového inhibitoru Boc-D-CMK. Na buněčné linii U937 jsme prokázali, že tato látka je cytotoxická a indukuje v nízkých koncentracích apoptózu, ve vysokých pak nekrózu (Frydrych et al., 2008). Podobně jako TPCK, indukuje také Boc-D-CMK aktivaci kaspasy-3 (Obr. 31) rovněž i ve vysokých koncentracích, kdy je aktivita kaspasy-3 zcela inhibována (Frydrych et al., 2008).



Obr. 31. Vliv TPCK a Boc-D-CMK na aktivaci kaspasy-3. Buňky HL-60 byly ovlivněny TPCK (25 a 50μM) a buňky U937 byly vystaveny zvyšující se koncentraci Boc-D-CMK, jak je naznačeno. Aktivace kaspasy-3 u obou linií byla analyzována pomocí western-blotingu 18 h po přidání inhibitorů do růstového média. Kontrola reprezentuje neovlivněné buňky. Obrázky představují typické výsledky (Frydrych a Mlejnek, 2008b; Frydrych et al., 2008).

Přestože jsou cytotoxické účinky TPCK a TLCK známy již více než tři desetiletí, mechanismem jejich působení se dlouho nikdo nezabýval. Teprve v nedávné době byly rozpoznány první potenciální molekulární cíle těchto látek (Wu et al., 1996). Bylo popsáno, že TPCK a TLCK brání aktivaci kinasy pp70 (s6k) po působení PDGF (platelet-derived growth factor) nebo PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; Grammer a Blenis, 1996). Tato kinasa se kromě kontroly translace také významně podílí na regulaci buněčného cyklu. Jiným cílem inhibitorů serinových proteas může být signální dráha NF-κB. Bylo prokázáno, že aktivaci NF-κB účinkem cytokinu nebo lypopolysacharidu lze potlačit aplikací TCPK nebo TLCK (Breithaupt et al., 1996; D'Acquisto et al., 1997).

Na základě naměřených antiproliferačních účinků TPCK a TLCK jsme studovali možný vliv těchto látek na signální dráhy zahrnující MAP (mitogen activated protein) kinasy. Zaměřili jsme se na vybrané MAP kinasy, které se přímo podílí na regulaci jak proliferace, tak také buněčné smrti. Naše výsledky však prokázaly, že TPCK ani TLCK neinhibují kinasu ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2; Obr. 32) a zároveň nemají žádný vliv na aktivaci ani expresi SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun NH_2-terminal kinase; Obr. 32) a p38 MAP kinasy (není ukázáno).



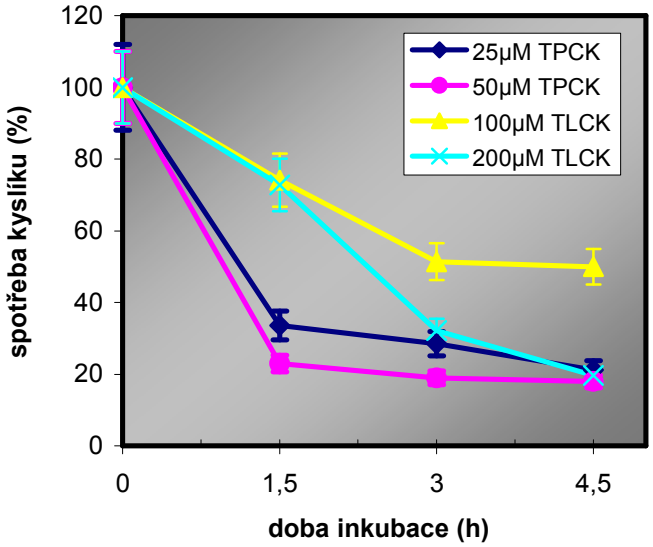
Obr. 32. Vliv TPCK a TLCK na aktivaci a expresi vybraných MAP kinas u buněk HL-60. Buňky byly kultivovány v růstovém médiu obsahujícím 5μM TPCK nebo 25μM TLCK. Po 3 h byla analyzována exprese a aktivace SAPK/JNK kinasy (**levý panel**) a ERK1/2 kinasy (**pravý panel**) western-blotem s využitím specifických protilátek (Cell Signaling Technology). Množství nanášených proteinů bylo normalizováno na aktin (nepublikované výsledky).

Cytotoxicita TPCK a TLCK zřejmě nesouvisí s jejich modulačními účinky na hlavní MAP kinasové signální dráhy. Nelze však vyloučit, že k aktivaci vybraných stresových kinas (SAPK/JNK nebo p38 MAP kinasa) může docházet jen přechodně a velmi časně po aplikaci inhibitorů. Tuto možnost jsme však neověřovali.

Jak již bylo zmíněno, nalezli jsme analogii mezi účinky TPCK (TLCK) a Boc-D-CMK na aktivaci kaspasy-3. Bylo také zmíněno, že Boc-D-CMK, navzdory své funkci nespecifického kaspasového inhibitoru, vykazuje vlastnosti cytotoxické látky. Při detailnějším studiu cytotoxického působení Boc-D-CMK u buněčné linie U937 jsme zjistili, že tato látka primárně interferuje s metabolismem mitochondrií, což se manifestuje velmi časnou inhibicí respirace a následně disipací transmembránového potenciálu (Frydrych et al., 2008). Domníváme se, že toxicita Boc-D-CMK a inhibitorů serinových proteas zřejmě souvisí s přítomností chloromethylketonové funkční skupiny, která udílí těmto látkám na jedné straně obrovskou reaktivitu, avšak nízkou specifitu na straně druhé. Lze tedy předpokládat, že cytotoxické účinky těchto inhibitorů nespočívají ani tak v inhibici serinových, cysteinových nebo jiných proteas, jako spíš v jejich všeobecné interakci s různorodými molekulárními a buněčnými cíli. Tento předpoklad lze dokumentovat konkrétními nálezy z literatury. Byla například popsána interakce TPCK a TLCK s HPV-18 E7 (human papillomavirus) proteinem, který je spojován s rakovinou děložního čípku. Tato interakce brání vazbě Rb proteinu, známého nádorového supresoru (Stöppler et al., 1996). Alkylační působení TPCK se projevuje také inaktivací transkripčních faktorů

STAT5 (signal transducer and activator of transcription) a STAT6, které sehrávají významnou úlohu v patogenezi některých nádorových onemocnění (Perez et al., 2008).

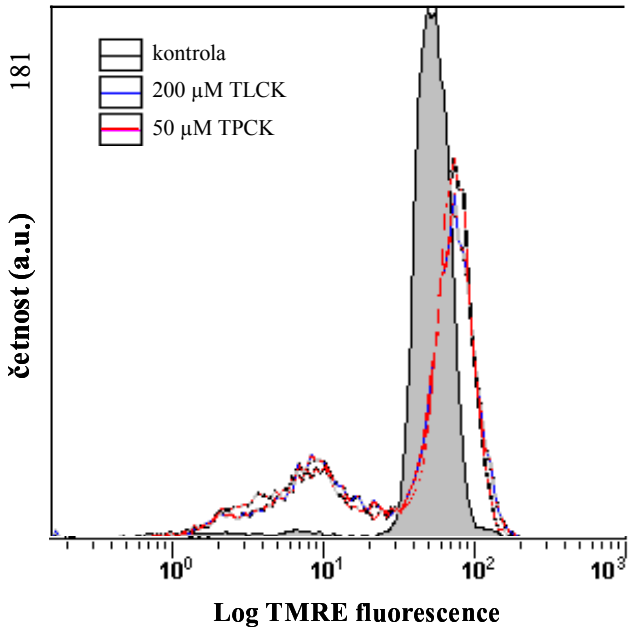
Na základě pozorování cytotoxického působení Boc-D-CMK na mitochondrie jsme dále zkoumali, zda mitochondrie není také cílem cytotoxických účinků TPCK a TLCK. Zjistili jsme, že aplikace TLCK a TPCK vede u buněk HL-60 k ireverzibilní inhibici respirace, jež se projevuje sníženou spotřebou kyslíku. Zároveň jsme prokázali, že k tomuto efektu dochází velmi časně po přídavku inhibitorů do růstového média a především v případě TPCK jde o efekt velmi výrazný (Obr. 33).



Obr. 33. Vliv TPCK a TLCK na respiraci buněk HL-60. Buňky byly ovlivněny TPCK (25 a 50μM) nebo TLCK (100 a 200μM), jak je naznačeno. Spotřeba kyslíku (respirační aktivita) byla měřena v 1,5-hodinových intervalech pomocí Clarkovy kyslíkové elektrody. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní odchylkou. Kontrolu reprezentují neovlivněné buňky (100 % spotřeby kyslíku).

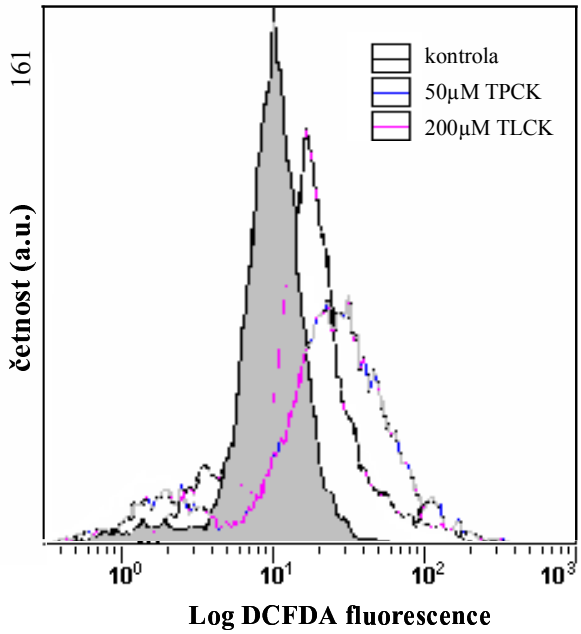
Tyto výsledky jasně naznačily, že cytotoxické působení TLCK a TPCK by mohlo souviset s funkcí mitochondrií. Proto jsme se v následující fázi zaměřili na studium dalších parametrů, které odráží funkčnost mitochondrií. Zjistili jsme, že aplikace inhibitorů serinových proteas indukuje změny na úrovni mitochondriálního transmembránového potenciálu, které jsou poněkud komplexní. Na jedné straně lze pozorovat disipaci $\Delta\Psi$ u populace mrtvých buněk (nízká fluorescence TMRE), zatímco zvýšena fluorescence (nad úroveň neovlivněných buněk) u populace živých buněk odráží hyperpolarizaci jejich mitochondrií (Obr. 34). Oba pozorované efekty mohou

souviset s dalšími jevy, jako je produkce ROS nebo změna intracelulární koncentrace Ca^{2+}.

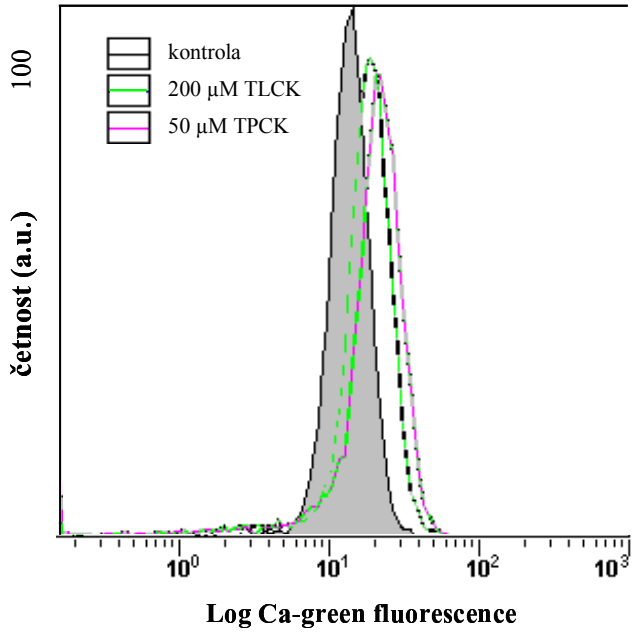


Obr. 34. Vliv TPCK a TLCK na mitochondriální transmembránový potenciál (ΔΨ) u buněk HL-60. Buňky byly kultivovány v médiu obsahujícím 50µM TPCK (**červená čára**) nebo 200µM TLCK (**modrá čára**) po dobu 1,5 h. ΔΨ byl následně monitorován pomocí průtokové cytometrie (postup uveden ve Frydrych et al., 2008). Obrázek reprezentuje typické histogramy. V každém vzorku bylo analyzováno nejméně 15 000 buněk. Kontrolu představují buňky rostoucí v médiu bez TPCK, resp. TLCK.

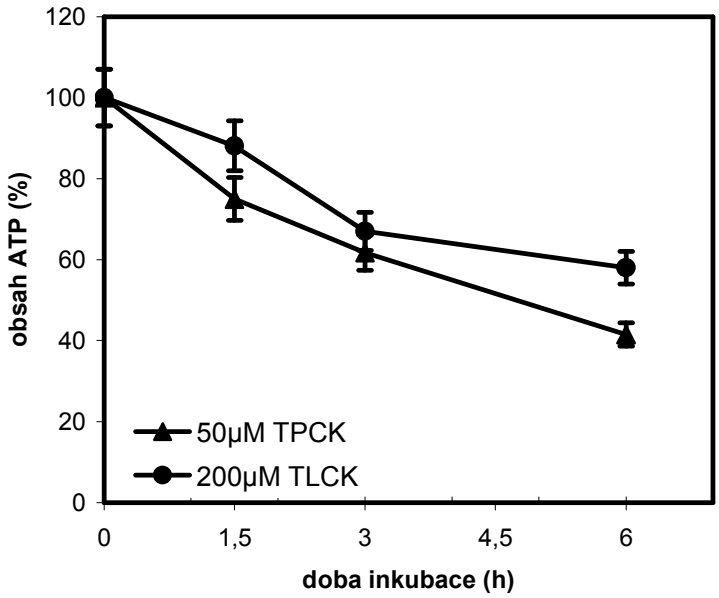
Naše experimenty dále ukázaly, že TPCK i TLCK indukují u buněk HL-60 zvýšenou produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), což potvrzuje zásah těchto látek do respiračního řetězce (Obr. 35). Pokusy o nalezení konkrétního komplexu respiračního řetězce, který může být přednostně inhibován TPCK nebo TLCK však nevedly k úspěšnému cíli. Mitochondriální dysfunkce se dále manifestovala nárůstem intracelulární koncentrace vápenatých iontů (Obr. 36) a poklesem hladiny ATP (Obr. 37). Pozorované snížení intracelulární hladiny ATP však není příliš dramatické, což může souviset s kompenzační produkcí ATP z glykolýzy, kterou nádorové buňky hojně využívají jako alternativní zdroj energie (Shaw, 2006).



Obr. 35. Vliv TLCK a TPCK na produkci reaktivních kyslíkových radikálů u buněk HL-60. Buňky byly kultivovány v médiu obsahujícím 50µM TPCK (**modrá křivka**) nebo 200µM TLCK (**růžová křivka**) po dobu 1,5 h. 20 min. před skončením inkubační doby byl do buněčné suspenze přidán DCFDA (10µM) a analýza probíhala, jak je uvedeno v metodických postupech. Obrázek znázorňuje typické histogramy.



Obr. 36. Vliv TPCK a TLCK na intracelulární koncentraci vápníku (Ca^{2+}). Buňky byly inkubovány v přítomnosti 50µM TPCK (**růžová křivka**) nebo 200µM TLCK (**zelená křivka**) po dobu 1,5 h. Intracelulární koncentrace Ca^{2+} byla stanovena pomocí fluorescenční sondy Calcium green-1/acetoxymethyl ester (calcium green-1/AM) podle postupu uvedeného v metodách. Obrázek znázorňuje typické histogramy. Kontrolu představují neovlivněné buňky.



Obr. 37. Vliv TLCK a TPCK na biosyntézu ATP u buněčné linie HL-60. Buňky byly inkubovány v přítomnosti 50μM TPCK nebo 200μM TLCK a v pravidelných časových intervalech (1,5 - 6 h) extrahovány TCA (trichloroctová kyselina). Obsah ATP byl v extraktech stanoven bioluminometricky. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní odchylkou. Kontrolu představují neovlivněné buňky (100 % obsahu ATP).

Dosažené výsledky naznačují, že mechanismus cytotoxického působení inhibitorů serinových proteas TPCK a TLCK je značně komplexní a projevuje se na mnoha úrovních. Naše výsledky zároveň ukazují, že jedním z důležitých cílů cytotoxického působení obou látek je zřejmě mitochondrie. Nejvýraznějším a nejdříve měřitelným projevem narušené funkce mitochondrií účinkem TPCK a TLCK je inhibice buněčné respirace. V tomto ohledu obě látky velmi připomínají cytotoxické účinky Boc-D-CMK, alespoň tedy na úrovni inhibice buněčné respirace a disipace ΔΨ (Frydrych et al., 2008).

Závěr:

1. Inhibitory serinových proteas TPCK a TLCK jsou cytotoxické látky, které u buněk inhibují proliferaci a indukují buněčnou smrt.

2. Nízké koncentrace TPCK a TLCK indukují apoptózu s typickými morfologickými a biochemickými znaky, zatímco vysoké koncentrace způsobují spíše nekrózu.

3. Cytotoxické účinky TPCK a TLCK zřejmě nesouvisí s jejich působením na vybrané MAP kinasy.

4. Mitochondrie představují jeden z možných důležitých cílů cytotoxického působení TPCK a TLCK.

5. Nejvýraznějším a velmi časným projevem mitochondriální dysfunkce po aplikaci TPCK a TLCK je inhibice respirace.

6. Cytotoxicita TPCK a TLCK může souviset s přítomností chloromethylketonového rezidua v jejich molekule.

8 Shrnutí

Předložená dizertační práce se zaměřuje na problematiku modulace buněčné smrti inhibitory serinových a kaspasových proteas.

Inhibitory serinových proteas TLCK (N-α-tosyl-L-lysinyl-chloromethylketon) a TPCK (N-tosyl-L-phenylalaninyl-chloromethylketon) jsou reaktivní sloučeniny, které projevují řadu vedlejších biochemických účinků na buňky. Zřejmě nejvíce rozporuplné výsledky se týkají vlivu těchto látek na modulaci apoptózy. V souladu s jinými autory jsme zjistili, že TLCK a TPCK inhibují nukleosomální fragmentaci jaderné DNA a aktivaci kaspasových proteas u buněk, které jsou vystaveny působení látek, jež indukují apoptózu. Naše výsledky dále ukázaly, že oba inhibitory potlačují kondenzaci chromatinu. TLCK na rozdíl od TPCK inhibuje také disipaci mitochondriálního transmembránového potenciálu. Ačkoliv inhibice morfologických a biochemických projevů apoptózy může být považována za protektivní účinek, TPCK ani TLCK neposkytují ve skutečnosti buňkám žádnou ochranu před smrtí. Buňky vystavené stimulům buněčné smrti v přítomnosti inhibitorů serinových proteas umírají ve stejné nebo dokonce vyšší četnosti, avšak charakter buněčné smrti se mění z apoptotického na nekrotický. Detailní analýza účinků TPCK a TLCK nám umožnila objasnit jejich nový, dosud nepopsaný mechanismus působení na výkonné kaspasy. Využitím lidských rekombinantních kaspas jsme jednoznačně prokázali, že TPCK a TLCK přímo inhibují již aktivované výkonné kaspasy. Zároveň jsme ukázali, že vliv těchto látek na samotnou aktivaci kaspasových proteas je minimální nebo žádný. Na základě získaných výsledků se domníváme, že pozorované účinky TPCK a TLCK zřejmě souvisí především s inhibicí výkonných kaspas.

Dále jsme zjistili, že TPCK a TLCK jsou v obvykle používaných koncentracích cytotoxické samy o sobě. Při snaze o nalezení možného mechanismu cytotoxického působení těchto inhibitorů se překvapivě ukázalo, že TPCK ani TLCK nemají vliv na aktivaci či expresi vybraných stresových MAP kinas, jako je SAPK/JNK nebo p38 MAP kinasa. Možný inhibiční vliv těchto látek na ERK1/2 kinasu rovněž nebyl pozorován. Na základě našich výsledků i výsledků publikovaných v literatuře lze předpokládat, že cytotoxické účinky TPCK a TLCK jsou do značné míry komplexní a projevují se na mnoha úrovních, protože obě látky jsou vysoce reaktivní a málo

specifické, což vede k interakci s různými molekulárními a buněčnými cíli. Naše experimenty ukázaly, že mitochondrie představují jeden z možných důležitých cílů jejich účinku. Nejvýraznějším a zároveň velmi časným projevem narušené funkce mitochondrií po aplikaci TLCK a TPCK je inhibice respirace. Mitochondriální dysfunkce se dále manifestovala zvýšenou produkcí reaktivních kyslíkových radikálů, změnami intracelulární koncentrace vápníku a sníženou produkcí ATP. Cytotoxické účinky inhibitorů serinových proteas jsou v mnoha aspektech srovnatelné s působením nespecifického kaspasového inhibitoru Boc-D-CMK, který také inhibuje respiraci buněk.

9 Summary

The aim of this Ph.D. thesis was to study the modulation of cell death induction by inhibitors of serine and caspase proteases.

Serine protease inhibitors TLCK (N-α-tosyl-L-lysinyl-chloromethylketone) and TPCK (N-tosyl-L-phenylalaninyl-chloromethylketone) are reactive compounds that exhibit a wide range of biochemical side effects on animal cells. Probably the most controversial data apply to the effects of these compounds on the apoptosis induction. Similarly to some authors, we found that TLCK and TPCK prevent nucleosomal fragmentation of genomic DNA, and inhibit caspase activation in cells exposed to pro-apoptotic stimuli. Our results further indicated that both inhibitors abrogate chromatin condensation. In addition, TLCK but not TPCK diminishes collapse of the mitochondrial transmembrane potential in the same experimental models. Although inhibition of certain morphological and biochemical hallmarks of apoptosis can be considered as cell protection we found that these effects are only presumable protective since neither TLCK nor TPCK actually prevent cells from death. Cells exposed to cell death inducing stimuli in the presence of these inhibitors still die at the same or even higher frequency as in their absence, however, the mode of the cell death is changing from apoptotic to necrotic one. Experiments with human recombinant caspases provided a convincing evidence that TPCK and TLCK could inhibit directly already activated effector caspases. Our results further revealed that the studied serine protease inhibitors act as nonspecific inhibitors of caspases with an efficiency comparable to that found for panspecific caspase inhibitor Boc-D-CMK. Simultaneously we demonstrated that neither TPCK nor TLCK inhibit caspase processing. Our findings revealed a novel mechanism for effector caspases inhibition by TPCK and TLCK. On the base of these results we assume that the observed effects of TPCK and TLCK are mainly related to the effector caspases inhibition.

Our data further suggested that TPCK and TLCK exhibit cytotoxic rather than cytoprotective effects on cells in routinely used concentrations. We tried to find a possible mechanism of the cytotoxic action of these serine protease inhibitors. Surprisingly we observed no effect of TPCK and TLCK on MAP kinase pathways. Specifically, TPCK and TLCK neither activate nor change expression of stress related

MAP kinases such as SAPK/JNK or p38 MAP kinase. No inhibitory effect of these serine protease inhibitors on ERK1/2 kinase was observed. On the base of our results and also results published by other authors it is evident that effects of TPCK and TLCK are rather complex as both compounds are highly reactive and non-selective. These properties predetermine their interaction with various molecular and cellular targets. We observed that mitochondria represent probably a primary cellular target for the cytotoxic action of TLCK and TPCK. Indeed, inhibition of cell respiration, reactive oxygen species production, increased level of intracellular Ca^{2+}, and drop in ATP level belong to the earliest observable events in cells exposed to either TPCK or TLCK. The cytotoxic effects of serine protease inhibitors are in many aspects comparable to those found for Boc-D-CMK, which also strongly disrupts mitochondrial functions.

10 Seznam použité literatury

Abate A, Schröder H. 1998. Protease inhibitors protect macrophages from lipopolysaccharide-induced cytotoxicity: possible role for NF-kappaB. *Life Sci* **62**: 1081-1088.

Adrain C, Martin SJ. 2001. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* **26**: 390-397.

Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 1997. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res* **57**: 615-619.

Ahmad R, Knafo L, Xu J, Sindhu ST, Menezes J, Ahmad A. 2000. Thrombin induces apoptosis in human tumor cells. *Int J Cancer* **87**: 707-715.

Alimonti JB, Shi L, Baijal PK, Greenberg AH. 2001. Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* **276**: 6974-6982.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**: 171.

Alva AS, Gultekin SH, Baehrecke EH. 2004. Autophagy in human tumors: cell survival or death? *Cell Death Differ* **11**: 1046-1048.

Anderson CL, Abraham GN. 1980. Characterization of the Fc receptor for IgG on a human macrophage cell line, U937. *J Immunol* **125**: 2735-2741.

Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG. 1979. K562--a human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer* **23**: 143-147.

Annand RR, Dahlen JR, Sprecher CA, De Dreu P, Foster DC, Mankovich JA, Talanian RV, Kisiel W, Giegel DA. 1999. Caspase-1 (interleukin-1beta-converting enzyme) is inhibited by the human serpin analogue proteinase inhibitor 9. *Biochem J* **342**: 655-665.

Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P, Ogier-Denis E. 2001. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* **276**: 35243-35246.

Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ. 2003. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J* **22**: 4385-4399.

Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, Mohler W, Han DK. 2003. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell* **4**: 587-598.

Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**: 1305-1308.

Atencio IA, Ramachandra M, Shabram P, Demers GW. 2000. Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor cell lines. *Cell Growth Differ* **11**: 247-253.

Baehrecke EH. 2005. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 505-510.

Bao Q, Shi Y. 2007. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* **14**: 56-65.

Barry M, Bleackley RC. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* **2**: 401-409.

Barry MA, Eastman A. 1993. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys* **300**: 440-450.

Barry MA, Reynolds JE, Eastman A. 1993. Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res* **53**: 2349-2357.

Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* **130**: 1910-1917.

Beere HM, Chresta CM, Alejo-Herberg A, Skladanowski A, Dive C, Larsen AK, Hickman JA. 1995. Investigation of the mechanism of higher order chromatin fragmentation observed in drug-induced apoptosis. *Mol Pharmacol* **47**: 986-996.

Beere HM, Chresta CM, Hickman JA. 1996. Selective inhibition of topoisomerase II by ICRF-193 does not support a role for topoisomerase II activity in the fragmentation of chromatin during apoptosis of human leukemia cells. *Mol Pharmacol* **49**: 842-851.

Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, Fan Z, Greer EL, Russo ML, Jaju M, Lieberman J. 2001. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem* **276**: 43285-43293.

Berry DL, Baehrecke EH. 2007. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila. *Cell* **131**: 1137-1148.

Bird PI. 1998. Serpins and regulation of cell death. *Results Probl Cell Differ* **24**: 63-89.

Blomgren K. 1999. Calpastatin is upregulated and acts as a suicide substrate to calpains in neonatal rat hypoxia-ischemia. *Ann N Y Acad Sci* **890**: 270-271.

Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, Blenis J, Tschopp J. 2000. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* **2**: 241-243.

Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* **270**: 7795-7798.

Bories D, Raynal MC, Solomon DH, Darzynkiewicz Z, Cayre YE. 1989. Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Cell* **59**: 959-968.

Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G. 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* **25**: 1025-1040.

Breithaupt TB, Vazquez A, Baez I, Eylar EH. 1996. The suppression of T cell function and NF(kappa)B expression by serine protease inhibitors is blocked by N-acetylcysteine. *Cell Immunol* **173**: 124-130.

Bröker LE, Huisman C, Span SW, Rodriguez JA, Kruyt FA, Giaccone G. 2004. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* **64**: 27-30.

Bruno S, Del Bino G, Lassota P, Giaretti W, Darzynkiewicz Z. 1992. Inhibitors of proteases prevent endonucleolysis accompanying apoptotic death of HL-60 leukemic cells and normal thymocytes. *Leukemia* **6**: 1113-1120.

Bursch W. 2001. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* **8**: 569-581.

Cain K. 2003. Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome. *Drug Metab Rev* **35**: 337-363.

Candé C, Vahsen N, Kouranti I, Schmitt E, Daugas E, Spahr C, Luban J, Kroemer RT, Giordanetto F, Garrido C, Penninger JM, Kroemer G. 2004. AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene* **23**: 1514-1521.

Candi E, Schmidt R, Melino G. 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 328-340.

Carafoli E, Molinari M. 1998. Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun* **247**: 193-203.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**: 2825-2837.

Cilenti L, Lee Y, Hess S, Srinivasula S, Park KM, Junqueira D, Davis H, Bonventre JV, Alnemri ES, Zervos AS. 2003. Characterization of a novel and specific inhibitor for the pro-apoptotic protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem* **278**: 11489-11494.

Cirman T, Oresić K, Mazovec GD, Turk V, Reed JC, Myers RM, Salvesen GS, Turk B. 2004. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem* **279**: 3578-3587.

Clarke PG. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* **181**: 195-213.

Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326**: 1-16.

Cohen JJ, Duke RC. 1984. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* **132**: 38-42.

Collins JA, Schandi CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC. 1997. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* **45**: 923-934.

Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. 1977. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* **270**: 347-349.

Costantini P, Jacotot E, Decaudin D, Kroemer G. 2000. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* **92**: 1042-1053.

Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS. 2002. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* **158**: 507-517.

Croall DE, DeMartino GN. 1991. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* **71**: 813-847.

Cuervo AM. 2004. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* **263**: 55-72.

D'Acquisto F, Iuvone T, Rombolà L, Sautebin L, Di Rosa M, Carnuccio R. 1997. Involvement of NF-kappaB in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. *FEBS Lett* **418**: 175-178.

Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, Takeuchi H, Kondo Y, Kondo S. 2004. Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res* **64**: 4286-4293.

Danial NN, Korsmeyer SJ. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* **116**: 205-219.

Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prévost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G. 2000. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* **14**: 729-739.

Dolle RE, Hoyer D, Prasad CV, Schmidt SJ, Helaszek CT, Miller RE, Ator MA. 1994. P1 aspartate-based peptide alpha-((2,6-dichlorobenzoyl)oxy)methyl ketones as potent time-dependent inhibitors of interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Med Chem* **37**: 563-564.

Dong Z, Saikumar P, Patel Y, Weinberg JM, Venkatachalam MA. 2000. Serine protease inhibitors suppress cytochrome c-mediatedcaspase-9 activation and apoptosis during hypoxia-reoxygenation. *Biochem J* **347**: 669-677.

Donovan M, Cotter TG. 2004. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* **1644**: 133-147.

Drenth J, Kalk KH, Swen HM. 1976. Binding of chloromethyl ketone substrate analogues to crystalline papain. *Biochemistry* **15**: 3731-3738.

Drexler HC. 1997. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 855-860.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**: 33-42.

Dyche WJ. 1979. A comparative study of the differentiation and involution of the Mullerian duct and Wolffian duct in the male and female fetal mouse. *J Morphol* **162**: 175-209.

Eastman A, Barry MA. 1992. The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? *Cancer Invest* **10**: 229-240.

Eaton JW, Qian M. 2002. Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic Biol Med* **32**: 833-840.

Ellis HM, Horvitz HR. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans. *Cell* **44**: 817-829.

Emori Y, Kawasaki H, Imajoh S, Imahori K, Suzuki K. 1987. Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 3590-3594.

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.

Faccio L, Fusco C, Chen A, Martinotti S, Bonventre JV, Zervos AS. 2000. Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J Biol Chem* **275**: 2581-2588.

Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. 1999. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun* **266**: 699-717.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**: 2207-2216.

Festjens N, Vanden Berghe T, Cornelis S, Vandenabeele P. 2007. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ* **14**: 400-410.

Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 1371-1387.

Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**: 76-100.

Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, Elling F, Leist M, Jäättelä M. 2001. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* **153**: 999-1010.

French LE, Tschopp J. 1999a. Inhibition of death receptor signaling by FLICE-inhibitory protein as a mechanism for immune escape of tumors. *J Exp Med* **190**: 891-894.

French LE, Tschopp J. 1999b. The TRAIL to selective tumor death. *Nat Med* **5**: 146-147.

Froelich CJ, Orth K, Turbov J, Seth P, Gottlieb R, Babior B, Shah GM, Bleackley RC, Dixit VM, Hanna W. 1996. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem* **271**: 29073-29079.

Frydrych I, Mlejnek P, Dolezel P, Zoumpourlis V, Krumpochova P. 2008. The broad-spectrum caspase inhibitor Boc-Asp-CMK induces cell death in human leukaemia cells. *Toxicol In Vitro* **22**: 1356-1360.

Frydrych I, Mlejnek P. 2008a. Serine protease inhibitors N-alpha-tosyl-L-lysinyl-chloromethylketone (TLCK) and N-tosyl-L-phenylalaninyl-chloromethylketone (TPCK) are potent inhibitors of activated caspase proteases. *J Cell Biochem* **103**: 1646-1656.

Frydrych I, Mlejnek P. 2008b. Serine protease inhibitors N-alpha-tosyl-L-lysinyl-chloromethylketone (TLCK) and N-tosyl-L-phenylalaninyl-chloromethylketone (TPCK) do not inhibit caspase-3 and caspase-7 processing in cells exposed to pro-apoptotic inducing stimuli. *J Cell Biochem* **105**: 1501-1506.

Fuentes-Prior P, Salvesen GS. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* **384**: 201-232.

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* **14**: 1237-1243.

Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, Tasdemir E, Maiuri MC, Kroemer G. 2008. To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr Mol Med* **8**: 78-91.

Gao G, Dou QP. 2000. N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem* **80**: 53-72.

Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM. 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* **123**: 321-334.

Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. 2007. Bid is cleaved upstream of caspase-8 activation during TRAIL-mediated apoptosis in human osteosarcoma cells. *Apoptosis* **12**: 1299-1315.

Garrido C, Kroemer G. 2004. Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 639-646.

Garrido C, Schmitt E, Candé C, Vahsen N, Parcellier A, Kroemer G. 2003. HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* **2**: 579-584.

Gilmore AP. 2005. Anoikis. *Cell Death Differ* **12**: 1473-1477.

Golstein P, Kroemer G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* **32**: 37-43.

Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz RJ, Gong J, Darzynkiewicz Z. 1992. DNA strand breaks occurring during apoptosis: Their early in situ detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *Int J Oncol* 1: 639-648.

Grabarek J, Darzynkiewicz Z. 2002. In situ activation of caspases and serine proteases during apoptosis detected by affinity labeling their enzyme active centers with fluorochrome-tagged inhibitors. *Exp Hematol* **30**: 982-989.

Grammer TC, Blenis J. 1996. The serine protease inhibitors, tosylphenylalanine chloromethyl ketone and tosyllysine chloromethyl ketone, potently inhibit pp70s6k activation. *J Biol Chem* **271**: 23650-23652.

Gravestein LA, Borst J. 1998. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin Immunol* **10**: 423-434.

Gray CW, Ward RV, Karran E, Turconi S, Rowles A, Viglienghi D, Southan C, Barton A, Fantom KG, West A, Savopoulos J, Hassan NJ, Clinkenbeard H, Hanning C, Amegadzie B, Davis JB, Dingwall C, Livi GP, Creasy CL. 2000. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur J Biochem* **267**: 5699-56710.

Green DR, Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**: 626-629.

Grossman WJ, Revell PA, Lu ZH, Johnson H, Bredemeyer AJ, Ley TJ. 2003. The orphan granzymes of humans and mice. *Curr Opin Immunol* **15**: 544-552.

Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. 2004. Lysosomes in cell death. *Oncogene* **23**: 2881-2890.

Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 2002. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* **277**: 13430-13437.

Gupta S, Agrawal A, Agrawal S, Su H, Gollapudi S. 2006. A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immun Ageing* **3**: 5.

Ha HC, Snyder SH. 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13978-13982.

Harper N, Hughes M, MacFarlane M, Cohen GM. 2003. Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 25534-25541.

Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 2002. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* **277**: 432-438.

Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Wickel M, Schneider-Brachert W, Trauzold A, Hethke A, Schütze S. 2004. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ* **11**: 550-563.

Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.

Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. 1994. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* **76**: 977-987.

Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G. 1997. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* **15**: 1573-1581.

Hirschhorn R, Grossman J, Troll W, Weissmann G. 1971. The effect of epsilon amino caproic acid and other inhibitors of proteolysis upon the response of human peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin. *J Clin Incest* **50**: 1206-1217.

Hishita T, Tada-Oikawa S, Tohyama K, Miura Y, Nishihara T, Tohyama Y, Yoshida Y, Uchiyama T, Kawanishi S. 2001. Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39. *Cancer Res* **61**: 2878-2884.

Holcik M, Gibson H, Korneluk RG. 2001. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* **6**: 253-261.

Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. 2004. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* **25**: 259-264.

Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, Xanthoudakis S, Roy S, Black C, Grimm E, Aspiotis R, Han Y, Nicholson DW, Karl IE. 2000. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol* **1**: 496-501.

Huang DC, Strasser A. 2000. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* **103**: 839-842.

Chan SL, Mattson MP. 1999. Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res* **58**: 167-190.

Chauvier D, Ankri S, Charriaut-Marlangue C, Casimir R, Jacotot E. 2007. Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality? *Cell Death Differ* **14**: 387-391.

Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC, Gottlieb RA. 2001. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* **276**: 30724-30728.

Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. 1994. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* **263**: 1759-1762.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**: 505-512.

Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. 2006. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* **13**: 1396-1402.

Chou IN, Black PH, Roblin RO. 1974. Non-selective inhibition of transformed cell growth by a protease inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 1748-1752.

Chua BT, Guo K, Li P. 2000. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem* **275**: 5131-5135.

Imajoh S, Kawasaki H, Suzuki K. 1986. Limited autolysis of calcium-activated neutral protease (CANP): reduction of the Ca2+-requirement is due to the NH2-terminal processing of the large subunit. *J Biochem* **100**: 633-642.

Inohara N, Koseki T, Chen S, Benedict MA, Núñez G. 1999. Identification of regulatory and catalytic domains in the apoptosis nuclease DFF40/CAD. *J Biol Chem* **274**: 270-274.

Inomata M, Kasai Y, Nakamura M, Kawashima S. 1988. Activation mechanism of calcium-activated neutral protease. Evidence for the existence of intramolecular and intermolecular autolyses. *J Biol Chem* **263**: 19783-19787.

Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schröter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**: 190-195.

Ishidoh K, Kominami E. 2002. Processing and activation of lysosomal proteinases. *Biol Chem* **383**: 1827-1831.

Ishisaka R, Utsumi T, Kanno T, Arita K, Katunuma N, Akiyama J, Utsumi K. 1999. Participation of a cathepsin L-type protease in the activation of caspase-3. *Cell Struct Funct* **24**: 465-470.

Jabbour AM, Ekert PG, Coulson EJ, Knight MJ, Ashley DM, Hawkins CJ. 2002. The p35 relative, p49, inhibits mammalian and Drosophila caspases including DRONC and protects against apoptosis. *Cell Death Differ* **9**: 1311-1320.

Jameson SC, Hogquist KA, Bevan MJ. 1995. Positive selection of thymocytes. *Annu Rev Immunol* **13**: 93-126.

Jia Z, Hasnain S, Hirama T, Lee X, Mort JS, To R, Huber CP. 1995. Crystal structures of recombinant rat cathepsin B and a cathepsin B-inhibitor complex. Implications for structure-based inhibitor design. *J Biol Chem* **270**: 5527-5533.

Johansson AC, Steen H, Ollinger K, Roberg K. 2003. Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. *Cell Death Differ* **10**: 1253-1259.

Johnson DE. 2000. Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia* **14**: 1695-1703.

Jones RA, Johnson VL, Buck NR, Dobrota M, Hinton RH, Chow SC, Kass GE. 1998. Fas-mediated apoptosis in mouse hepatocytes involves the processing and activation of caspases. *Hepatology* **27**: 1632-1642.

Kass GE, Eriksson JE, Weis M, Orrenius S, Chow SC. 1996. Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. *Biochem J* **318**: 749-752.

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**: 2013-2026.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257.

Kerr JF. 1971. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* **105**: 13-20.

Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2001. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* **2**: 330-335.

Kim JS, He L, Lemasters JJ. 2003. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **304**: 463-470.

King MA, Halicka HD, Darzynkiewicz Z. 2004. Pro- and anti-apoptotic effects of an inhibitor of chymotrypsin-like serine proteases. *Cell Cycle* **3**: 1566-1571.

Kitanaka C, Kuchino Y. 1999. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* **6**: 508-515.

Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, Bamber BA, Bassham DC, Bergamini E, Bi X, Biard-Piechaczyk M, Blum JS, Bredesen DE, Brodsky JL, Brumell JH, Brunk UT, Bursch W, Camougrand N, Cebollero E, Cecconi F, et al.. 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **4**: 151-175.

Kobayashi S, Yamashita K, Takeoka T, Ohtsuki T, Suzuki Y, Takahashi R, Yamamoto K, Kaufmann SH, Uchiyama T, Sasada M, Takahashi A. 2002. Calpain-mediated X-linked inhibitor of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia. *J Biol Chem* **277**: 33968-33977.

Komiyama T, Ray CA, Pickup DJ, Howard AD, Thornberry NA, Peterson EP, Salvesen G. 1994. Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J Biol Chem* **269**: 19331-19337.

Krammer PH. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**: 789-795.

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* **12**: 1463-1467.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**: 99-163.

Kroemer G, Jäättelä M. 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* **5**: 886-897.

Kumar S, Baglioni C. 1991. Protection from tumor necrosis factor-mediated cytolysis by overexpression of plasminogen activator inhibitor type-2. *J Biol Chem* **266**: 20960-20964.

Kuwana T, Smith JJ, Muzio M, Dixit V, Newmeyer DD, Kornbluth S. 1998. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* **273**: 16589-16594.

Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y. 2002. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* **297**: 1352-1354.

Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC. 2006. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol* **7**: 216.

Lazebnik YA, Cole S, Cooke CA, Nelson WG, Earnshaw WC. 1993. Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J Cell Biol* **123**: 7-22.

Lee SK, Lee JY, Lee MY, Chung SM, Chung JH. 1999. Advantages of calcium green-1 over other fluorescent dyes in measuring cytosolic calcium in platelets. *Anal Biochem* 273: 186-191.

Leist M, Jäättelä M. 2001. Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Differ* **8**: 324-326.

Levine B, Klionsky DJ. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**: 463-477.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**: 491-501.

Li LY, Luo X, Wang X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**: 95-99.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489.

Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**: 672-676.

Lin Y, Choksi S, Shen HM, Yang QF, Hur GM, Kim YS, Tran JH, Nedospasov SA, Liu ZG. 2004. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J Biol Chem* **279**: 10822-10828.

Lippens S, Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. 2005. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ* **12**: 1497-1508.

Lippens S, Kockx M, Knaapen M, Mortier L, Polakowska R, Verheyen A, Garmyn M, Zwijsen A, Formstecher P, Huylebroeck D, Vandenabeele P, Declercq W. 2000. Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ* **7**: 1218-1224.

Lithgow T, van Driel R, Bertram JF, Strasser A. 1994. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ* **5**: 411-417.

Liu N, Wang Y, Ashton-Rickardt PG. 2004. Serine protease inhibitor 2A inhibits caspase-independent cell death. *FEBS Lett* **569**: 49-53.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**: 147-157.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**: 487-501.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 741-752.

Mancini M, Machamer CE, Roy S, Nicholson DW, Thornberry NA, Casciola-Rosen LA, Rosen A. 2000. Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol* **149**: 603-612.

Mandic A, Viktorsson K, Strandberg L, Heiden T, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. 2002. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **22**: 3003-3013.

Mannick JB, Schonhoff C, Papeta N, Ghafourifar P, Szibor M, Fang K, Gaston B. 2001. S-Nitrosylation of mitochondrial caspases. *J Cell Biol* **154**: 1111-1116.

Martins LM, Turk BE, Cowling V, Borg A, Jarrell ET, Cantley LC, Downward J. 2003. Binding specificity and regulation of the serine protease and PDZ domains of HtrA2/Omi. *J Biol Chem* **278**: 49417-49427.

McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S. 1989. Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *FASEB J* **3**: 1843-1849.

McConkey DJ. 1996. Calcium-dependent, interleukin 1-converting enzyme inhibitor-insensitive degradation of lamin B1 and DNA fragmentation in isolated thymocyte nuclei. *J Biol Chem* **271**: 22398-22406.

Micheau O, Tschopp J. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**: 181-190.

Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA. 2001. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem* **276**: 16391-16398.

Mizushima N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev* **21**: 2861-2873.

Mlejnek P, Dolezel P. 2005. Apoptosis induced by N6-substituted derivatives of adenosine is related to intracellular accumulation of corresponding mononucleotides in HL-60 cells. *Toxicol In Vitro* 19: 985-990.

Mlejnek P. 2005. Can application of serine protease inhibitors TPCK and TLCK provide evidence for possible involvement of serine protease Omi/HtrA2 in imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL-positive human leukemia cells? *Leukemia* **19**: 1085-1087.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.

Murachi T, Tanaka K, Hatanaka M, Murakami T. 1980. Intracellular Ca2+-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Adv Enzyme Regul* **19**: 407-424.

Murn J, Urleb U, Mlinaric-Rascan I. 2004. Internucleosomal DNA cleavage in apoptotic WEHI 231 cells is mediated by a chymotrypsin-like protease. *Genes Cells* **9**: 1103-1111.

Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**: 2926-2930.

Nagaraj NS, Vigneswaran N, Zacharias W. 2006. Cathepsin B mediates TRAIL-induced apoptosis in oral cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **132**: 171-183.

Nagata S. 2005. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol* **23**: 853-875.

Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. 2005. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434**: 652-658.

Nakagawa T, Yuan J. 2000. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* **150**: 887-894.

Nakanishi K, Maruyama M, Shibata T, Morishima N. 2001. Identification of a caspase-9 substrate and detection of its cleavage in programmed cell death during mouse development. *J Biol Chem* **276**: 41237-41244.

Neufeld TP, Baehrecke EH. 2008. Eating on the fly: function and regulation of autophagy during cell growth, survival and death in Drosophila. *Autophagy* **4**: 557-562.

Neumar RW, Xu YA, Gada H, Guttmann RP, Siman R. 2003. Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 14162-14167.

Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC. 1994. Cell-free apoptosis in Xenopus egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* **79**: 353-364.

Nicotera P, Bano D. 2003. The enemy at the gates. Ca2+ entry through TRPM7 channels and anoxic neuronal death. *Cell* **115**: 768-767.

Nicholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **22**: 299-306.

Nicholson DW. 1996. ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nat Biotechnol* **14**: 297-301.

Nylandsted J, Brand K, Jäättelä M. 2000. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* **926**: 122-125.

Oberhammer F, Bursch W, Parzefall W, Breit P, Erber E, Stadler M, Schulte-Hermann R. 1991. Effect of transforming growth factor beta on cell death of cultured rat hepatocytes. *Cancer Res* **51**: 2478-2485.

Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. 1993. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* **12**: 3679-3684.

Oda T, Komatsu N, Muramatsu T. 1998. Diisopropylfluorophosphate (DFP) inhibits ricin-induced apoptosis of MDCK cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**: 325-333.

Okada M, Adachi S, Imai T, Watanabe K, Toyokuni SY, Ueno M, Zervos AS, Kroemer G, Nakahata T. 2004. A novel mechanism for imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL-positive human leukemic cells: caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediated by serine protease activity. *Blood* **103**: 2299-2307.

Op den Kamp JA. 1979. Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem* **48**: 47-71.

Paavola LG. 1978. The corpus luteum of the guinea pig. III. Cytochemical studies on the Golgi complex and GERL during normal postpartum regression of luteal cells, emphasizing the origin of lysosomes and autophagic vacuoles. *J Cell Biol* **79**: 59-73.

Pardo J, Pérez-Galán P, Gamen S, Marzo I, Monleón I, Kaspar AA, Susín SA, Kroemer G, Krensky AM, Naval J, Anel A. 2001. A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis. *J Immunol* **167**: 1222-1229.

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**: 927-939.

Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG, Tschopp J. 1993. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J* **12**: 371-377.

Perez-G M, Cortes JR, Rivas MD, Masa F, Zamorano J. 2008. Treatment of cells with n-alpha-tosyl-L-phenylalanine-chloromethyl ketone induces the proteolytic loss of STAT6 transcription factor. *Mol Immunol* **45**: 3896-3901.

Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaart EF, Meijer AJ, Codogno P. 2000. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* **275**: 992-998.

Pörn-Ares MI, Samali A, Orrenius S. 1998. Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death Differ* **5**: 1028-1033.

Porter AG, Jänicke RU. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* **6**: 99-104.

Pyo JO, Jang MH, Kwon YK, Lee HJ, Jun JI, Woo HN, Cho DH, Choi B, Lee H, Kim JH, Mizushima N, Oshumi Y, Jung YK. 2005. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem* **280**: 20722-20729.

Raff MC, Whitmore AV, Finn JT. 2002. Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* **296**: 868-871.

Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maisse C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jäättelä M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. 2001. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* **3**: 839-843.

Rawlings ND, Barrett AJ. 1994. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol* **244**: 19-61.

Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS, Pickup DJ. 1992. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* **69**: 597-604.

Reimertz C, Kögel D, Lankiewicz S, Poppe M, Prehn JH. 2001. Ca(2+)-induced inhibition of apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: degradation of apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1). *J Neurochem* **78**: 1256-1266.

Roberg K, Johansson U, Ollinger K. 1999. Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **27**: 1228-1237.

Roberg K, Ollinger K. 1998. Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Am J Pathol* **152**: 1151-1156.

Roberts LR, Adjei PN, Gores GJ. 1999. Cathepsins as effector proteases in hepatocyte apoptosis. *Cell Biochem Biophys* **30**: 71-88.

Rodriguez I, Matsuura K, Ody C, Nagata S, Vassalli P. 1996. Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. *J Exp Med* **184**: 2067-2072.

Rodriguez J, Lazebnik Y. 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13**: 3179-3184.

Rotter B, Kroviarski Y, Nicolas G, Dhermy D, Lecomte MC. 2004. AlphaII-spectrin is an in vitro target for caspase-2, and its cleavage is regulated by calmodulin binding. *Biochem J* **378**: 161-168.

Ruggiero V, Johnson SE, Baglioni C. 1987. Protection from tumor necrosis factor cytotoxicity by protease inhibitors. *Cell Immunol* **107**: 317-325.

Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **23**: 2861-2874.

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. 1999. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* **107**: 489-506.

Sakahira H, Enari M, Nagata S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**: 96-99.

Salvesen GS, Dixit VM. 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**: 443-446.

Salvesen GS, Dixit VM. 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10964-10967.

Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, Schumacher A, Prchal JT, Chen M, Wang J. 2008. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* **454**: 232-235.

Sarin A, Nakajima H, Henkart PA. 1995. A protease-dependent TCR-induced death pathway in mature lymphocytes. *J Immunol* **154**: 5806-5812.

Sasaki T, Yoshimura N, Kikuchi T, Hatanaka M, Kitahara A, Sakihama T, Murachi T. 1983. Similarity and dissimilarity in subunit structures of calpains I and II from various sources as demonstrated by immunological cross-reactivity. *J Biochem* **94**: 2055-2061.

Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, Ghidoni R, Codogno P. 2004. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem* **279**: 18384-18391.

Shaw RJ. 2006. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 598-608.

Shimizu T, Pommier Y. 1997. Camptothecin-induced apoptosis in p53-null human leukemia HL60 cells and their isolated nuclei: effects of the protease inhibitors Z-VAD-fmk and dichloroisocoumarin suggest an involvement of both caspases and serine proteases. *Leukemia* **11**: 1238-1244.

Shintani T, Klionsky DJ. 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**: 990-995.

Shiokawa D, Tanuma S. 1998. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding an apoptotic endonuclease DNase gamma. *Biochem J* **332**: 713-720.

Shiokawa D, Tanuma S. 2001. Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis. *Biochemistry* **40**: 143-152.

Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. 1998. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* **10**: 581-587.

Schotte P, Declercq W, Van Huffel S, Vandenabeele P, Beyaert R. 1999. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett* **442**: 117-121.

Smirnova IV, Zhang SX, Citron BA, Arnold PM, Festoff BW. 1998. Thrombin is an extracellular signal that activates intracellular death protease pathways inducing apoptosis in model motor neurons. *J Neurobiol* **36**: 64-80.

Sorimachi H, Saido TC, Suzuki K. 1994. New era of calpain research. Discovery of tissue-specific calpains. *FEBS Lett* **343**: 1-5.

Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H. 2002. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J* **21**: 4520-4530.

Squìer MK, Miller AC, Malkinson AM, Cohen JJ. 1994. Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol* **159**: 229-237.

Stassi G, De Maria R. 2002. Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **2**: 195-204.

Stefanis L, Troy CM, Qi H, Greene LA. 1997. Inhibitors of trypsin-like serine proteases inhibit processing of the caspase Nedd-2 and protect PC12 cells and sympathetic neurons from death evoked by withdrawal of trophic support. *J Neurochem* **69**: 1425-1437.

Stegh AH, Herrmann H, Lampel S, Weisenberger D, Andrä K, Seper M, Wiche G, Krammer PH, Peter ME. 2000. Identification of the cytolinker plectin as a major early in vivo substrate for caspase 8 during CD95- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* **20**: 5665-5679.

Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM, Salvesen GS. 1999. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* **274**: 8359-8362.

Stenson-Cox C, FitzGerald U, Samali A. 2003. In the cut and thrust of apoptosis, serine proteases come of age. *Biochem Pharmacol* **66**: 1469-1474.

Stöppler H, Stöppler MC, Adduci A, Koval D, Schlegel R. 1996. The serine protease inhibitors TLCK and TPCK react with the RB-binding core of HPV-18 E7 protein and abolish its RB-binding capability. *Virology* **217**: 542-553.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. 2000. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* **69**: 217-245.

Strasser A. 2005. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* **5**: 189-200.

Suffys P, Beyaert R, Van Roy F, Fiers W. 1988. Involvement of a serine protease in tumour-necrosis-factor-mediated cytotoxicity. *Eur J Biochem* **178**: 257-265.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**: 441-446.

Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, Browne KA, Trapani JA. 2000. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med* **192**: 1403-1414.

Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. 2001. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**: 613-621.

Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD, Wong WW. 1997. Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* **272**: 9677-9682.

Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca++dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **135**: 397-402.

Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Qui YH, Monks A, Andreeff M, Reed JC. 2000. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* **6**: 1796-1803.

Temkin V, Huang Q, Liu H, Osada H, Pope RM. 2006. Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis. *Mol Cell Biol* **26**: 2215-2225.

Thiemmara V, Pays L, Danty E, Jourdan F, Moyse E, Mehlen P. 2002. Serine protease inhibitor Spi2 mediated apoptosis of olfactory neurons. *Cell Death Differ* **9**: 1343-1351.

Thompson EA. 1991. Insensitivity to the cytolytic effects of glucocorticoids in vivo is associated with a novel "slow death" phenotype. *Cancer Res* **51**: 5544-5550.

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**: 768-774.

Thornberry NA, Chapman KT, Nicholson DW. 2000. Determination of caspase specificities using a peptide combinatorial library. *Methods Enzymol* **322**: 100-110.

Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* **281**: 1312-1316.

Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **272**: 17907-17911.

Tinel A, Tschopp J. 2004. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* **304**: 843-846.

Torriglia A, Perani P, Brossas JY, Chaudun E, Treton J, Courtois Y, Counis MF. 1998. L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor. *Mol Cell Biol* **18**: 3612-3619.

Troll W, Klassen A, Janoff A. 1970. Tumorigenesis in mouse skin: inhibition by synthetic inhibitors of proteases. *Science* **169**: 1211-1213.

Turk B, Stoka V. 2007. Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Lett* **581**: 2761-2767.

Valentino KL, Gutierrez M, Sanchez R, Winship MJ, Shapiro DA. 2003. First clinical trial of a novel caspase inhibitor: anti-apoptotic caspase inhibitor, IDN-6556, improves liver enzymes. *Int J Clin Pharmacol Ther* **41**: 441-449.

van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenabeele P. 2001. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* **8**: 1136-1142.

van Maanen JM, Retèl J, de Vries J, Pinedo HM. 1988. Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review. *J Natl Cancer Inst* **80**: 1526-1533.

Van Noorden CJ. 2001. The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem* **103**: 241-251.

Vancompernolle K, Van Herreweghe F, Pynaert G, Van de Craen M, De Vos K, Totty N, Sterling A, Fiers W, Vandenabeele P, Grooten J. 1998. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett* **438**: 150-158.

Vandenabeele P, Vanden Berghe T, Festjens N. 2006. Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Sci STKE* **2006**: 44.

Vaughan PJ, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD. 1995. Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *J Neurosci* **15**: 5389-5401.

Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandenabeele P. 1998a. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* **187**: 1477-1485.

Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, Van de Craen M, Declercq W, Fiers W, Vandenabeele P. 1998b. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med* **188**: 919-930.

Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. 2001. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol* **2**: 1-10.

Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, Morselli E, Ben Younes A, Maiuri MC, Lavandero S, Kroemer G. 2008. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology* **54**: 92-99.

Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13884-13888.

Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D. 2002. Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in Caenorhabditis elegans. *Science* **298**: 1587-1592.

Weaver VM, Lach B, Walker PR, Sikorska M. 1993. Role of proteolysis in apoptosis: involvement of serine proteases in internucleosomal DNA fragmentation in immature thymocytes. *Biochem Cell Biol* **71**: 488-500.

Welss T, Sun J, Irving JA, Blum R, Smith AI, Whisstock JC, Pike RN, von Mikecz A, Ruzicka T, Bird PI, Abts HF. 2003. Hurpin is a selective inhibitor of lysosomal cathepsin L and protects keratinocytes from ultraviolet-induced apoptosis. *Biochemistry* **42**: 7381-7389.

Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT. 2001. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem* **276**: 48404-48409.

Williams MS, Henkart PA. 1994. Apoptotic cell death induced by intracellular proteolysis. *J Immunol* **153**: 4247-4255.

Wood DE, Newcomb EW. 1999. Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**: 8309-8315.

Wood DE, Thomas A, Devi LA, Berman Y, Beavis RC, Reed JC, Newcomb EW. 1998. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene* **17**: 1069-1078.

Wright SC, Schellenberger U, Wang H, Kinder DH, Talhouk JW, Larrick JW. 1997. Activation of CPP32-like proteases is not sufficient to trigger apoptosis: inhibition of apoptosis by agents that suppress activation of AP24, but not CPP32-like activity. *J Exp Med* **186**: 1107-1117.

Wright SC, Schellenberger U, Wang H, Wang Y, Kinder DH. 1998. Chemotherapeutic drug activation of the AP24 protease in apoptosis: requirement for caspase 3-like-proteases. *Biochem Biophys Res Commun* **245**: 797-803.

Wright SC, Zheng H, Zhong J. 1996. Tumor cell resistance to apoptosis due to a defect in the activation of sphingomyelinase and the 24 kDa apoptotic protease (AP24). *FASEB J* **10**: 325-332.

Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsura M, Katz D, FitzGerald MJ, Rothstein TL, Sherr DH, Sonenshein GE. 1996. Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J* **15**: 4682-4690.

Wyllie AH. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**: 555-556.

Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. 1996. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14559-14563.

Xie Z, Klionsky DJ. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**: 1102-1109.

Yakovlev AG, Wang G, Stoica BA, Simbulan-Rosenthal CM, Yoshihara K, Smulson ME. 1999. Role of DNAS1L3 in Ca2+- and Mg2+-dependent cleavage of DNA into oligonucleosomal and high molecular mass fragments. *Nucleic Acids Res* **27**: 1999-2005.

Yamashima T, Kohda Y, Tsuchiya K, Ueno T, Yamashita J, Yoshioka T, Kominami E. 1998. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. *Eur J Neurosci* **10**: 1723-1733.

Yang L, Sugama S, Mischak RP, Kiaei M, Bizat N, Brouillet E, Joh TH, Beal MF. 2004. A novel systemically active caspase inhibitor attenuates the toxicities of MPTP, malonate, and 3NP in vivo. *Neurobiol Dis* **17**: 250-259.

Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. 1998. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* **97**: 276-281.

Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H. 2002. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* **9**: 680-684.

Yeung BH, Huang DC, Sinicrope FA. 2006. PS-341 (bortezomib) induces lysosomal cathepsin B release and a caspase-2-dependent mitochondrial permeabilization and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* **281**: 11923-11932.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. 1993. The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**: 641-652.

Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15077-15082.

Zain J, Huang YQ, Feng X, Nierodzik ML, Li JJ, Karpatkin S. 2000. Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells. *Blood* **95**: 3133-3138.

Zhou Q, Krebs JF, Snipas SJ, Price A, Alnemri ES, Tomaselli KJ, Salvesen GS. 1998. Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry* **37**: 10757-10765.

Zhou Q, Snipas S, Orth K, Muzio M, Dixit VM, Salvesen GS. 1997. Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem* **272**: 7797-7800.

Zong WX, Thompson CB. 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* **20**: 1-15.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**: 405-413.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. J Biol Chem 274: 11549-11556. Boya P, Kroemer G. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* **27**: 6434-6451.

11 Seznam zkratek

ACBP	„Acyl CoA-binding Protein“ – protein obsažený v mezimembránovém prostoru mitochondrií
AIF	apoptotický indukční faktor
AMC	7-amino-4-methylkumarin
ANT	„Adenine Nucleotide Translocase“ - adenin-nukleotid translokační tunel
AP24	„24 kDa Apoptotic Protease“ – serinová proteasa o velikosti 24 kDa
Apaf-1	„Apoptotic Protease Activating Factor-1“
***Atg* geny**	rodina genů podílejících se na regulaci autofagie
ATP	adenosintrifosfát
Bad	zástupce podskupiny BH3-only proapoptotických proteinů
Bak	multidoménový proapoptotický Bcl-2 protein
Bax	multidoménový proapoptotický Bcl-2 protein
Bcl-2	„B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia 2“ - zástupce Bcl-2 rodiny s anti-apoptotickým účinkem
Bcl-xL	zástupce Bcl-2 rodiny s anti-apoptotickým účinkem
BH3-only	skupina jednodoménových, proapoptotických proteinů
BH-domain	„Bcl-2 homology domain“
Bid	zástupce podskupiny BH3-only proapoptotických proteinů
Bim	zástupce podskupiny BH3-only proapoptotických proteinů
BIR	„Baculoviral IAP Repeat“ – klíčová doména IAP proteinů
BNIP3	mitochondriální protein, zástupce rodiny Bcl-2
Boc-D-CMK	*t*-butoxy karbonyl-aspartát-chloromethylketon - nespecifický kaspasový inhibitor
CAD	„Caspase-activated DNase“ – kaspasou aktivovaná endonukleasa
CARD domain	„Caspase Activation and Recruitment Domain“
caspases	„Cysteinyl Aspartate Proteinases“ – specifické apoptotické proteasy (kaspasy)
ced-3	gen smrti u háďátka obecného
c-FLIPs	„FADD-like ICE (FLICE)-inhibitory Proteins“ – fyziologické buněčné inhibitory caspas
CMK	chloromethylketon
CrmA	„Cytokine Response Modifier A“ – zástupce serpinů inhibující kaspasové proteasy
CTLs	cytotoxické T-lymfocyty
Da/kDa	dalton/kilodalton - jednotka pro vyjádření relativní molekulové hmotnosti proteinů
dATP	deoxyadenosintrifosfát
DCFDA	2',7'-dichlorofluorescein diacetát
DCI	3,4-dichloroisokumarín
DD	„Death Domain“ – doména smrti
DED doména	„Death Effector Domain“
$DiOC_6(3)$	3,3′-dihexyloxacarbocyanin jodide
DISC	„Death-Inducing Signaling Complex“ – komplex zprostředkovávající aktivaci kaspasy-8
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	„DNA-dependent Protein Kinase“ - DNA-dependentní proteinkinasa
DNAS1L2	savčí endonuklesa
DNasa	protein štěpící DNA
Endo G	endonukleasa G
ERK1/2	„Extracellular Signal-regulated Kinases 1/2“
ETP	etoposid
FABP1	„Fatty Acid-binding Protein“
FADD	„Fas-associated Death Domain“ - adaptorový protein podílející se na aktivaci kaspas
FAK	„Focal Adhesion Kinase“ - fokální adhezní kinasa
FAOM	fluoroacyloxymethyl
Fas	receptor smrti vázající FasL
FasL	Fas-ligand

FBS	„Fetal Bovine Serum“ - fetální hovězí sérum
FFCK	fluoresceinyl-L-phenylalanine chloromethylketone
FLISPs	„Fluorescent Inhibitor of Serine Proteases“
GAAD	„Granzyme A Activated DNase“
HL-60	buněčná linie odvozená od promyelocytární leukemie
HSP70	„Heat Shock Protein“ - protein tepelného šoku o velikosti 70 kDa
IAPs	„Inhibitors Of Apoptosis“ – rodina fyziologických inhibitorů kaspas
ICAD	„Inhibitor of Caspase Activated DNase“ - inhibitor kaspasou aktivované deoxyribonukleasy
ICE	„Interleukin-1β-converting Enzyme“ – proteasa zodpovědná za maturaci interleukinu 1β
IDN-6556	3-{2-[(2-*tert*-butyl-phenylaminooxalyl)-amino]-propionylamino}-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-phenoxy) valerová kyselina
IKK	komplex IκB kinasy
IL-1β	interleukin-1β – cytokin
IPA	N^6-isopentenyladenosin
IκB	„Inhibitor of NF-κB“ – inhibitor nukleárního faktoru κB
JNK1	„c-Jun NH(2)-terminal Protein Kinase“ – zástupce rodiny MAP kinas
K562	buněčná linie odvozená od chronické myeloidní leukemie
LC3-GFP	„Light Chain 3 - Green Fluorescence Protein“
LEI	„Leukocyte Elastase Inhibitor“ - zástupce fyziologických inhibitorů serinových proteas
LMP	„Lysosomal Membrane Permeabilization“ - permeabilizace lysozomální membrány
LPS	lipopolysacharid
man-6-P/IGF II R	„Mannose 6-phosphate/insulin-like Growth Factor II Receptor“
MAP	„Mitogen Activated Protein Kinase“ – mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MHC	„Major Histocompatibility Komplex“ - hlavní histokompatibilní komplex
MOMP	„Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization“ - permeabilizace vnější mitochondriální membrány
mTOR	„Mammalian Target of Rapamycin“ –Ser/Thr protein kinasa
MTT	3-4,5-dimethylazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium – tetrazoliová sůl
NADH	„Reduced Form of Nikotinamid Adenin Dinukleotid“
NF-κB	nukleární faktor κB – transkripční faktor
NK buňky	„Natural Killers“ – „přirození zabíječi“
NMDA	„N-methyl-D-aspartate Calcium Chanel“ - vápenatý kanál
Noxa	zástupce podskupiny BH3-only proapoptotických proteinů
OD	„Optical Density“ - absorbance
Omi/HtrA2	mitochondriální serinová proteasa
OMM	„Outer Mitochondrial Membrane“ - vnější mitochondriální membrána
p21	inhibitor cyklin dependentních proteinkinas
p35	bakulovirový produkt, fyziologický kaspasový inhibitor
p38	stresová MAP kinasa
p53	nádorový supresor
PAI-2	„Plasminogen Activator Inhibitor 2“ - fyziologický inhibitor serinových proteas
PAK2	„p21 Protein (Cdc42/Rac)-activated Kinase 2“ – protein kinasy aktivované p21
PARP1	„Poly (ADP-ribose) Polymerase Family, Member 1”
PBS	„Phosphate Buffered Saline“ - fosfátem pufrovaný fyziologický roztok
PDGF	„Platelet-derived Growth Factor“ - destičkový růstový faktor
PI3KC3	„Phosphatidylinositol 3-kinase, Class 3“
PI-9	„Proteinase Inhibitor 9“ - fyziologický inhibitor serinových proteas
PIDD	„p53 Induced Protein with a DD“
PKC	„Protein Kinase C“ - proteinkinasa C
PMA	„Phorbol 12-myristate 13-acetate“
PN-1	„Protease Nexin 1“ - inhibitor trombinu a dalších proteas
PP2A	„Protein Phosphatase 2A“
pp70-S6	„Ribosomal protein S6 kinase“
PTB	„Polypyrimidine Tract-binding Protein“
PTP	„Permeability Transition Pore“ – multimerní komplex proteinů uvnitř mitochondrií

PUMA	„p53 Upregulated Modulator of Apoptosis“ - zástupce podskupiny BH3-only proapoptotických proteinů
Q-VD-OPH	quinolyl-Val-Asp(OMe)-[2,6-difluorophenoxy)]-methylketone – všeobecný kaspasový inhibitor
RAIDD	„Receptor-interacting Protein (RIP)-associated ICH-1/CED-3 Homologous Protein“
Rb	retinoblastomový protein – nádorový supresor
RIP1	„Receptor Interacting Protein 1“
RNasa	protein štěpící RNA
ROS	„Reactive Oxygen Species“ - reaktivní kyslíkové radikály
RPMI-1640	„Medium Developed at Roswell Park Memorial Institute“ – růstové médium pro kultivaci buněk
SAPK/JNK	„Stress-activated Protein Kinase/c-Jun NH_2-terminal Dinase“ – zástupce stresových MAP kinas
serpin	**„**Serine Protease Inhibitor“– fyziologický inhibitor serinových proteas
Smac/Diablo	**„**Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low PI“
SPI	syntetické inhibitory serinových proteas
STAT	**„**Signal Transducer and Activator of Transcription“
STI 571	imatinib (glivec) – specifický inhibitor Bcr-Abl kinasy
STS	staurosporin
tBid	„Truncated Bid“ - aktivní forma proteinu Bid
TCA	trichloroctová kyselina
TLCK	N-tosyl-L-lysine chloromethylketone
TM	„COOH-terminal Transmembrane Domain“ – C-koncová doména Bcl-2 proteinů
TMRE	tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate
TNFR	„Tumor Necrosis Factor Receptor“ – receptor pro tumor-nekrotizující faktor
TNFα	„Tumor Necrosis Factor α “- tumor-nekrotizující faktor α
TPCK	N-tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone
TRADD	„TNF Receptor-associated Death Domain“
TRAF2	„TNF Receptor-associated Factor-2“
TRAIL	„Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand“
U937	buněčná linie odvozená z histiocytického lymfomu
UV	„Ultraviolet Radiation“ - ultrafialové záření
VDAC	„Voltage-dependent Anion Channel“ - napěťově dependentní aniontový kanál
z-VAD-fmk	benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)fluoromethylketone – všeobecný kaspasový inhibitor
ΔΨ	mitochondriální transmembránový potenciál

12 Seznam publikací a abstraktů

12.1 Práce související s dizertační prací

Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

Frydrych I, Mlejnek P. 2008. Serine protease inhibitors N-alpha-Tosyl-L-Lysinyl-Chloromethylketone (TLCK) and N-Tosyl-L-Phenylalaninyl-Chloromethylketone (TPCK) are potent inhibitors of activated caspase proteases. *Journal of Celullar Biochemistry* **103**: 1646-1656. **(IF = 3,5)**

Frydrych I, Mlejnek, P. 2008. Serine protease inhibitors N-α-Tosyl-L-Lysinyl-Chloromethylketone (TLCK) and N-Tosyl-L-Phenylalaninyl-Chloromethylketone (TPCK) do not inhibit caspase-3 and caspase-7 processing in cells exposed to pro-apoptotic inducing stimuli. *Journal of Cellular Biochemistry* **105**: 1501-1506. **(IF = 3,5)**

Frydrych I, Mlejnek P, Dolezel P, Zoumpourlis V, Krumpochova P. 2008. The broad-spectrum caspase inhibitor Boc-Asp-CMK induces cell death in human leukaemia cells. *Toxicology In Vitro* **22**: 1356-1360. **(IF = 2,5)**

Seznam přednášek/posterů

Frydrych I, Mlejnek P. N-α-tosyl-L-lysil-chloromethylketone (TLCK) inhibits many apoptotic features in dying K562 cells but it does not prevent cells from death. SSCT & ETS Joint Conference "Chemicals, Human & Enviroment", September 2006, Grinda, Sweden; poster.

Frydrych I, Mlejnek P. The broad spectrum caspase inhibitor Boc-Asp-CMK induces cell death in human leukaemia cells. The 25th SSCT workshop, September 2007, Salzau, Germany; lecture.

Frydrych I, Mlejnek. Serine protease inhibitors N-α-Tosyl-Lysinyl-Chloromethylketone (TLCK) and N-Tosyl-L-Phenylalaninyl-Chloromethylketone (TPCK) are potent inhibitors of activated caspase proteases. Seminář k záměru MŠM 6198959216, květen 2008, Karlov p. Pradědem; přednáška.

Frydrych I, Krumpochova P, Dolezel P, Mlejnek P. Serine protease inhibitors N-α-tosyl-L-lysinyl-chloromethylketone (TLCK) and N-tosyl-L-phenylalaninyl chloromethylketone (TPCK) exhibit adverse effects on mitochondrial function. The 15th International Congress on In Vitro Toxicology, September 2008, Djurönäset - Stockholm Archipelago, Sweden; poster.

12.2 Ostatní publikace a abstrakta

Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

Mlejnek P, **Frydrych I**, Dolezel P. 2007. Cyclosporin A potentiates cytotoxic effect of methyl methanesulfonate in HL-60 and K562 cells. *Alternatives To Laboratory Animals* **35**: 79-85. **(IF = 3,2)**

Frydrych I, Mlejnek P, Dolezel P. 2009. Cyclosporin A sensitises *Bcr-Abl* positive cells to imatinib mesylate independently of P-glykoprotein expression. *Toxicology In Vitro*. (přijato do tisku)

Publikovaná abstrakta

Frydrych I, Mlejnek P. N6-benzyladenine induces increased expression of adenine phosphoribosyltransferase mRNA in mammalian leukaemia cells. *Purinergic Signaling* **2**: p206, 2006. 8th International Symposium on Adenosine and Adenine Nucleotides, May 2006, Ferrara, Italy; poster.

Frydrych I, Dolezel P, Mlejnek P. P-glycoprotein overexpression confers resistance to A_3 adenosine receptor agonist 2-chloro-N^6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5′-N-methyluronamide (Cl-IB-MECA) in human leukemia cells. *Purinergic Signalling* **4** S198-S199, 2008. Purines 2008 Meeting, June 2008, Copenhagen, Denmark; poster.

Seznam přednášek/posterů

Mlejnek P, **Frydrych I**. Cyklosporin A zvyšuje citlivost BCR-ABL pozitivních buněk k imatinibu nezávisle na expresi P-glykoproteinu. XIX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, květen 2005, Olomouc; posterové sdělení.

Mlejnek P, **Frydrych I**. Cyclosporine A potentiates cytotoxic effect of methyl methansulfonate in HL-60 cells. SSCT & ETS Joint Conference "Chemicals, Human & Enviroment", October 2005, Toila, Estonia; poster.

Frydrych I, Mlejnek P. N6-benzyladenine induces increased expression of adenine phosphoribosyltransferase in human leukemia HL-60 cells. Seminář k záměru MŠM 6198959216, květen 2006, Sepetná; přednáška.

Mlejnek P, Doležel P, **Frydrych I**, Novotný J. Stanovení intracelulárního obsahu imatinibu u buněčné linie K562. XX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, květen 2006, Olomouc; posterové sdělení.

Frydrych I, Krumpochová P, Mlejnek P. Verapamil a cyklosporin A zvyšují účinnost cytotoxických látek u leukemických buněčných linií nezávisle na expresi P-glykoproteinu. XX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, květen 2006, Olomouc; posterové sdělení.

Mlejnek P, **Frydrych I**, Doležel P, Krumpochová P, Novotný J. The method for direct estimation of intracellular drug concentration. SSCT & ETS Joint Conference "Chemicals, Human & Enviroment", September 2006, Grinda, Sweden; lecture.

Krumpochová P, **Frydrych I**, Mlejnek P. Vliv inhibitorů P-glykoproteinu na účinnost protinádorových léčiv u buněčné linie K562. VII Česko-slovenské dny laboratorní hematologie, listopad 2006, Hradec Králové; přednáška.

Frydrych I, Mlejnek P. N6-benzyladenine potentiates cytotoxic effect of other bases by induction of increased aktivity of APRT enzyme. VII Česko-slovenské dny laboratorní hematologie, listopad 2006, Hradec Králové; přednáška.

Frydrych I, Krumpochová P, Mlejnek P. Mechanismus potenciace cytotoxického účinku imatinibu cyklosporinem A u buněk K562. Seminář k vědeckovýzkumnému záměru MŠM 6198959216, květen 2007, Karlov pod Pradědem; přednáška.

Krumpochová P, **Frydrych I**, Mlejnek P. Vliv cyklosporinu A a verapamilu na eflux imatinibu u leukemické buněčné linie exprimující P-glykoprotein. Seminář k vědeckovýzkumnému záměru MŠM 6198959216, květen 2007, Karlov pod Pradědem; přednáška.

Mlejnek P, Doležel P, **Frydrych I**, Novotný J. Some aspects of energy metabolism in apoptotic cells, The 25th SSCT workshop, September 2007, Salzau, Germany; lecture.

Mlejnek P, **Frydrych I**, Dolezel P. The indirect methods for assessment of P-glycoprotein function do not provide satisfactory evidence for the actual contribution of the P-glycoprotein mediated efflux to the multidrug resistance phenotype in cancer cells. 2nd FEBS Special Meeting on ABC Proteins, March 2008, Insbruck, Austria; poster.

Krumpochova P, **Frydrych I**, Dolezel P, Mlejnek P. Correlation between intracellular drug level and cell resistance in P-glycoprotein expressing tumor cells. 2nd FEBS Special Meeting on ABC Proteins, March 2008, Insbruck, Austria; poster.

Krumpochová P, **Frydrych I**, Doležel P, Mlejnek P. Kvantifikace příspěvku exprese P-glykoproteinu na vznik mnohočetné lékové rezistence u nádorových buněk XXII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, květen 2008, Olomouc; posterové sdělení.

Mlejnek P, **Frydrych I**, Dolezel P. Cyklosporin A sensitises *Bcr-Abl* positive cells to imatinib mesylate independently of P-glykoprotein expression. The 15th International Congress on In Vitro Toxicology, September 2008, Djurönäset - Stockholm Archipelago, Sweden; poster.

Mlejnek P, Dolezel P, **Frydrych I**. Cancer cells exhibit enhanced resistance to selective A_3 adenosine receptor agonist 2-chloro-N^6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5′-N-methyluronamide (Cl-IB-MECA) due to overexpression of P-glycoprotein. The 15th International Congress on In Vitro Toxicology, September 2008, Djurönäset - Stockholm Archipelago, Sweden; poster.