

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Barbora Votavová

Aktivace iniciačních kaspáz a regulace jejich aktivity

Activation of the initiation caspases and regulation of their activity

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ladislav Anděra CSc.

Praha, 2014

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli RNDr. Ladislavu Anděrovi CSc. za cenné připomínky a rady, které mi velmi pomohly při zpracování této bakalářské práce a dále všem, kteří mě při psaní podporovali.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22.8.2014

Podpis

OBSAH

ABSTRAKT.....	2
ABSTRACT.....	3
SEZNAM ZKRATEK.....	4
1. ÚVOD.....	5
2. AKTIVACE SAVČÍCH INICIAČNÍCH KASPÁZ A MULTIPROTEINOVÉ KOMPLEXY.....	8
2.1. Kaspáza-9 a její aktivace apoptosomem.....	9
2.2. Kaspázy-8 a -10 jejich aktivace DISCem.....	13
2.3. Kaspáza-2 a její aktivace PIDDosomem.....	19
3. REGULACE EXPRESE A AKTIVITY SAVČÍCH INICIAČNÍCH KASPÁZ.....	21
3.1. Transkripční regulace.....	21
3.2. Posttranslační modifikace.....	21
3.2.1. Fosforylace.....	21
3.2.2. Ubiquitinace.....	23
3.2.3. Nitrosylace.....	23
3.3. Protein-proteinové interakce.....	23
3.3.1. IAPs.....	23
3.3.2. c-FLIP.....	25
3.3.3. Bcl-2 proteiny.....	26
3.3.4. Heat shock proteiny.....	27
3.4. Neproteinové interakce (ionty, nukleotidy,...).....	27
3.4.1. Vápník.....	28
3.4.2. Draslík.....	28
3.4.3. Nukleotidy.....	29
4. AKTIVACE A REGULACE INICIAČNÍCH KASPÁZ V BUŇKÁCH BEZOBRATLÝCH ŽIVOČICHŮ.....	30
4.1. Drosophila melangoster - Dark, Dronc, DIAP1.....	30
4.2. Caenorhabditis elegans - CED-4, CED-3.....	31
5. ZÁVĚR.....	33
CITOVANÁ LITERATURA.....	35

ABSTRAKT

Kaspázy jsou jedny z klíčových proteinů podílejících se jak na aktivaci, tak i exekuci apoptózy. Vnější či vnitřní apoptotický signál vede k postupné aktivaci iniciačních a exekučních kaspáz. Aktivace iniciačních kaspáz je zprostředkována jejich procesováním v multiproteinových komplexech a aktivní iniciační kaspázy následně cíleně štěpí a tím i aktivují kaspázy efektorové. Tyto pak štěpí celé spektrum strukturních i funkčních buněčných proteinů, což vede k sebedestrukci buňky a k jejímu rozpadu do apoptotických tělísek. Vzhledem k zásadnímu významu iniciace apoptózy je jak aktivace, tak aktivita iniciačních (ale i efektorových) kaspáz důsledně regulována hned na několika úrovních. Primárně záleží na intenzitě a charakteru přijatého signálu, zda vůbec dojde ke zformování aktivačního kaspázového komplexu. Dále pak koncentrace iontů, nukleotidů a rozličných proteinů (proteiny z rodiny Bcl-2, inhibitory apoptózy (IAPs), heat shock proteiny, aj.) může taktéž výrazně ovlivnit jednotlivé kroky aktivace kaspáz. Samotné kaspázy mohou být posttranskripčně modifikovány (fosforylace, ubiquitinace,...) a tím buď inaktivovány, nebo naopak jejich aktivita může být zvýšena. Všechny tyto procesy tvoří složitou regulační síť, sloužící jak pro účinnou a správně načasovanou aktivaci kaspáz, tak i jako ochrana před nechtěným spuštěním apoptózy.

klíčová slova: kaspázy, apoptóza, multiproteinové komplexy, přenos signálu, DISC, Apaf-1, apoptosom

ABSTRACT

Caspases are the key proteins participating in both activation and execution of apoptosis. Extrinsic or intrinsic apoptotic signaling leads to sequential activation of the initiation and execution caspases. Activation of initiator caspases is mediated by their processing in multiprotein complexes and activated initiator caspases then specifically cleave and thus activate the effector caspases. These then cleave a number of structural and functional proteins, which consequently leads to cellular selfdestruction and its breakdown to apoptotic bodies. Considering the fundamental significance of the initiation of apoptosis, the activation as well as the activity of initiator (but also effector) caspases is strictly regulated at several levels. Primary the intensity and character of the recieved signal is crucial for the effective formation of the caspase activation complex. Then the concentration of intracellular ions, nucleotides and various proteins (proteins from the Bcl-2 family, inhibitors of apoptosis (IAPs), heat shock proteins,...) can also highly influence individual steps of caspase activation. Caspases themself can be posttranslationally modified (phosphorylated, ubiquitylated,...) and their activity can be either suppressed or also enhanced. All these processes form complex regulatory network serving both for the effective and timely activation of caspases and for the protection against unwanted triggering of apoptosis.

key words: caspases, apoptosis, multiprotein complexes, signal transduction, DISC, Apaf-1, apoptosome

SEZNAM ZKRATEK

AIF - apoptosis inducing factor

Apaf-1 - apoptotic protease activating factor-1

Bak - Bcl-2 antagonist/killer 1

Bax - Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 - B-cell lymphoma 2

Bid - Bcl-2 interacting domain death agonist

Bim - Bcl-2-interacting mediator of cell death

BIR - Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat

CARD - caspase recruitment domain

CED - cell death protein

Dark (též Ark) - Apaf-1 related killer 1

DD - death domain

DED - death effector domain

DIABLO - direct IAP-binding protein with low pI

DISC - death-inducing signaling complex

DR - death receptor

EGL-1 - egg laying defective 1

FADD - FAS-associating death domain-containing protein

FLIP - FLICE-like inhibitory protein

Hsp - heat shock protein

IAPs - inhibitors of apoptosis

IBM - IAP-binding motif

ICE - interleukin-1 β converting enzyme

NBD - nucleotide binding domain

NOD - nucleotide binding oligomerization domain

PIDD - p53-induced protein with a death domain

RAIDD - RIP-associated ICH-1/CED-3 homologous proteins with a death domain

ROS - reactive oxygen species

SMAC - second mitochondria-derived activator of caspase

TNF - tumor necrosis factor

TRADD - TNFR1-associated death domain protein

TRAIL - tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

1. ÚVOD

Apoptóza, nejrozšířenější forma programované buněčné smrti, je důležitý proces hrající nezastupitelnou roli v embryonálním vývoji a udržování homeostáze všech mnohobuněčných organismů. Dysregulace apoptózy může vést k závažným neurodegenerativním onemocněním, autoimunitním chorobám, rozvoji rakoviny aj.

První náznaky studia apoptózy můžeme sledovat již v 19. století - zabýval se jí mimo jiné např. německý biolog a zakladatel cytogenetiky Walther Flemming. Slovo apoptóza (apoptosis) jako první použil roku 1972 australský vědec John F. R. Kerr (Kerr et al, 1972). Tento termín má původ v řečtině a znamená *padání* - podle apoptotického odumření vrstvy buněk v řápíku při podzimním opadu listů.

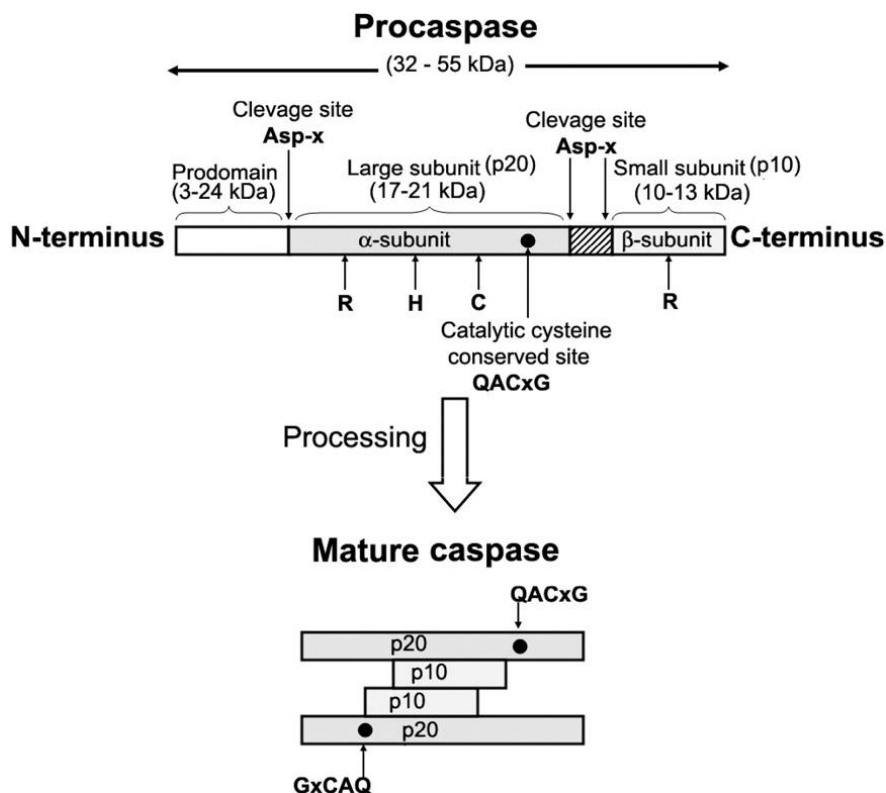
V současnosti jsou popsány dvě hlavní apoptotické dráhy - vnější, spouštěná například pomocí vazby ligandů smrti (TNF- α , TRAIL, Fas,...) na specifické receptory smrti na cytoplazmatické membráně, a vnitřní, aktivovatelná zejména buněčným stresem - poškození DNA, bakteriální nebo virová infekce, ROS, působení některých chemických látek (staurosporin, dexamethason,...).

V obou těchto drahách se zcela zásadním způsobem uplatňují specifické proteázy zvané kaspázy. Tyto proteiny mají název odvozený od své funkce, jedná se o cysteinové proteázy štěpící substrát za kyselinou asparagovou (anglicky caspases = cysteine proteases with **asp**artate substrate specificity)(Alnemri et al, 1996).

První popsanou savčí kaspázou byla lidská kaspáza-1, prvotně označovaná též jako ICE (interleukin 1 β -converting enzyme), tedy protein štěpící prekurzor interleukinu-1 β ve funkční IL-1 β (Cerretti et al, 1992; Thornberry et al, 1992). Zásadní pro pochopení zapojení kaspáz v apoptóze bylo až popsání strukturní a funkční podobnosti cysteinové proteázy CED-3 z *Caenorhabditis elegans* s ICE (Yuan et al, 1993) a odhalení možné proapoptotické funkce ICE (Miura et al, 1993). Proteáza CED-3 a její úloha v programované buněčné smrti byla poprvé popsána již o sedm let dříve (Ellis & Horvitz, 1986). Další objevenou lidskou kaspázou byla kaspáza-2 (zprvu známá pod názvem Ich-1) (Wang et al, 1994). Od té doby bylo charakterizováno mnoho dalších kaspáz a kaspázám příbuzných proteinů (parakaspázy, metakaspázy) v různých organismech a to včetně organismů nespádajících do říše Metazoa (např. bakterie, protista, rostliny, houby)(Uren et al, 2000). Savčích kaspáz je dnes známo 14, z toho 11

lidských. Kaspáza-13 je hovězí, kaspáza-11 je myší a prasečí a -12 je prasečí (* Degterev et al, 2003).

Všechny kaspázy sdílejí několik společných znaků. Skládají se ze tří domén: NH₂-terminální části (též prodoména), velké (~20kDa) a malé podjednotky (~10kDa). Na p20 podjednotce obsahují pentapeptidické katalytické místo obsahující sekvenci QACXG, kde X může být R, G, Q (Yuan et al, 1993). Jsou produkovány jako zymogeny bez enzymatické aktivity (popř. jen se zcela bazální aktivitou) a k jejich plné aktivaci dochází až po přijetí patřičných buněčných signálů. Vlastní aktivace je zajištěna vnitro-řetězcovým štěpením, při kterém dojde k oddělení velké a malé podjednotky, které posléze vytvoří vlastní aktivní kaspázu. U některých kaspáz (především iniciačních - viz. níže) bylo zjištěno, že toto štěpení není bezpodmínečně nutné pro aktivaci (Stennicke et al, 1999). Nejnovější studie však ukazují, že tento názor je možná mylný a pro plnou aktivaci je proteolytické zpracování nezbytné i u iniciačních kaspáz - konkrétně kaspázy-9 (Hu et al, 2013).



Obr. 1: Struktura a sestřih prokaspázy (převzato z Chowdhury et al, 2008) - Nahoře je znázorněna prodoména, velká a malá podjednotka, mezi nimi sestřihová místa, v p20 podjednotce znázorněno katalytické místo QACXG. Dole je vyobrazen dimer aktivní procesované kaspázy.

Kaspázy lze dělit podle 2 základních kritérií. Dle struktury je můžeme rozdělit do dvou hlavních kategorií: s dlouhou prodoménou (kaspázy-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12) a krátkou prodoménou (kaspázy-3, -6, -7, -14). Délka prodomény se pohybuje v rozsahu 23 (kaspázy-6 a -7) až 219 AMK (kaspáza-10). Druhým faktorem pro dělení je funkce. Podle té je rozčleňujeme mezi:

- apoptotické
 - iniciační (též apikální), kam spadají kaspázy-2, -8, -9, -10 a dále např. Dronc z *D. melanogaster*
 - efektorové (exekuční), kam patří kaspázy-3, -6, -7, -14 a dále např. Drice (*Drosophila*)(* Ho & Hawkins, 2005).
- prozánětlivé (kaspázy-1, -4, -5, -11)

Některé kaspázy mohou svou funkcí spadat do více skupin, například kaspáza-4 se uplatňuje jak při spouštění zánětu, tak při apoptóze a proteáza CED-3 z hád'átka plní jak funkci iniciační, tak efektorovou. Za povšimnutí stojí fakt, že všechny efektorové kaspázy zároveň spadají do kategorie s krátkou N-terminální doménou. Naproti tomu kaspázy prozánětlivé a iniciační obsahují na N-konci jednu nebo více adaptorových domén - CARD (caspase recruitment domain) v případě prozánětlivých a CARD nebo DED (death effector domain) u iniciačních kaspáz.

Hlavní rolí iniciačních apoptotických kaspáz je reagovat na proapoptotické signály, ať už z vnějšku či vnitřku buňky, a následně spouštět kaspázní kaskádu - tedy štěpením aktivovat kaspázy efektorové, které štěpí další substráty nezbytné pro indukci apoptotické buněčné smrti (* Thornberry & Lazebnik, 1998). Aktivace apikálních kaspáz je realizována v multiproteinových komplexech (DISC, apoptosom,...). Vzhledem k důležitosti spuštění či nespouštění apoptózy pro další buněčný osud, je jak aktivace, tak následná aktivita iniciačních kaspáz důsledně kontrolována a regulována.

Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky týkající se aktivace iniciačních proapoptotických kaspáz, stavby multiproteinových aktivačních komplexů a vybraných mechanismů regulace kaspázové aktivity a stručné srovnání těchto mechanismů napříč živočišnými druhy.

2. AKTIVACE SAVČÍCH INICIAČNÍCH KASPÁZ A MULTIPROTEINOVÉ KOMPLEXY

Zatímco přesný princip aktivace efektorových kaspáz je již delší dobu znám, konkrétní detaily a průběh aktivace iniciačních kaspáz byly po mnoho let ne zcela vyjasněny. První teorie, se kterou se pracovalo, byl model indukované blízkosti (induced proximity model) (Salvesen & Dixit, 1999). Podle tohoto modelu se monomery kaspázy-8 vzájemně auto-aktivovaly poté, co se dostaly do těsné blízkosti. Během pokusů dokazujících tuto teorii byly ovšem do buňky dodávány kaspázy fúzované s heterologní dimerizační doménou, případně s doménou vázající se na protein FK506 a uměle syntetizovaný dimer tohoto proteinu - FK1012 (MacCorkle et al, 1998; Muzio et al, 1998; Srinivasula et al, 1998). Tak sice docházelo k umělé dimerizaci a aktivaci kaspáz, nicméně zůstalo nevysvětleno, jak k této dimerizaci dochází za přirozených podmínek.

Druhou teorií byla blízkostí řízená dimerizace (proximity-driven dimerization). Ta, na rozdíl od předchozí, brala v úvahu i specifickou změnu konformace kaspáz během aktivace - bylo zjištěno, že po zformování homodimeru kaspázy-9 se vytvoří pouze jedno aktivní místo (Renatus et al, 2001). Za úlohu apoptosomu a DISCu bylo považováno zvýšení lokální koncentrace kaspáz a tím zajištění homodimerizace a následné aktivace (Boatright et al, 2003; Renatus et al, 2001).

Pozdější teorie indukované konformace (induced conformation model) vznikla na základě detailní studie heptamerického komplexu apoptosomu (Acehan et al, 2002). Podle té na sebe apoptosom naváže 7 inaktivních monomerů kaspázy-9, dojde tak k lokálnímu zvýšení jejich koncentrace a zajištění navázání dalších monomerů - u těch se změní konformace aktivního místa a aktivují se. V roce 2005 byla zveřejněna studie, která potvrzovala teorii, že při aktivaci apoptosomem dochází ke změně konformace aktivního místa kaspázy. Po zkonstruování umělého homodimeru kaspázy-9 vykazovala tato vyšší aktivitu než přirozená kaspáza-9, avšak v porovnání s aktivitou kaspázy aktivované apoptosomem byla její aktivita výrazně nižší (Chao et al, 2005).

Podle nejnovějšího modelu, který se nazývá model blízkostí indukované asociace (proximity-induced association model), hraje důležitou roli asociace katalytických domén prokaspázy-9 s nukleotid vázající doménou (NBD) apoptosomu. Pro správnou

aktivaci kaspázy-9 je také nutná vhodná délka spojovacího úseku mezi její prodoménou a p20 podjednotkou a mezi p20 a p10 podjednotkami. Pokud byla v případě prokaspázy-9 zkrácena spojka mezi CARD doménou a p20 jednotkou o 30 AMK (tedy z původních 49 AMK na 19), byla následná aktivita prokaspázy-9 inhibována zhruba o 80 % (Yuan et al, 2011a).

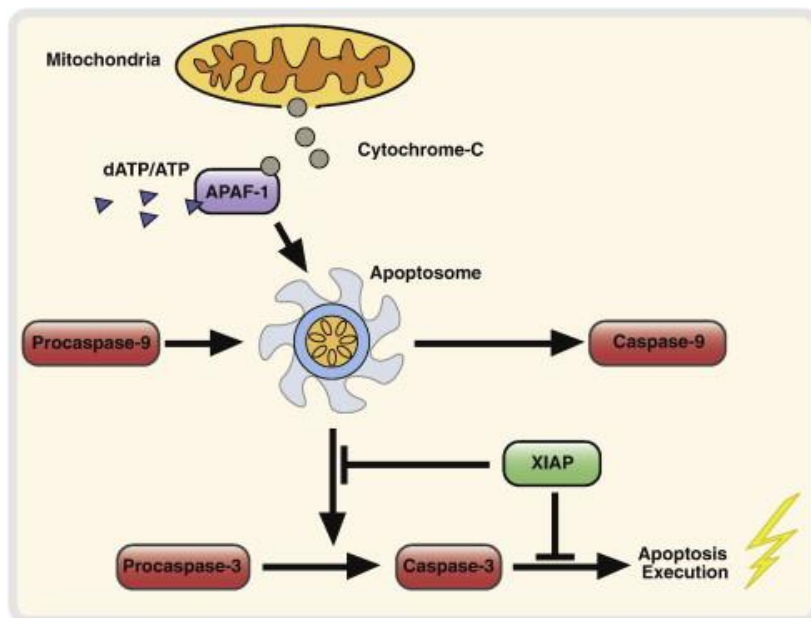
2.1. Kaspáza-9 a její aktivace apoptosomem

Kaspáza-9 je mezi iniciačními apoptotickými kaspázami nejlépe prozkoumaným enzymem. Narušená schopnost aktivace kaspázy-9 byla potvrzena jako jeden z faktorů přispívajících k rozvoji rakoviny vaječníků (Liu et al, 2002). Většina casp-9 deficientních myší zemřela perinatálně (před porodem nebo těsně po něm) následkem morfologické deformace a hypertrofie předního mozku - důsledek nedostatečného apoptotického odumírání buněk během vývoje (Kuida et al, 1998). Tyto dva a mnoho dalších výstupů potvrzují esenciální význam kaspázy-9 pro správnou funkci organismu.

Prodoména kaspázy-9 obsahuje jednu CARD doménu. Prostřednictvím této domény může být prokaspáza-9 vázána na multiproteinový komplex zvaný apoptosom, který zajistí její aktivaci. K tvorbě apoptosomu dochází při spuštění vnitřní apoptotické dráhy - poškození DNA, oxidativní stres, hypoxie, nedostatek živin, případně jiný podobný podnět zapříčiní aktivaci tzv. BH3-only proteinů z Bcl-2 rodiny, které se podílejí na homooligomeraci proteinů Bax (Bcl-2-associated X protein) či Bak (Bcl-2 antagonist killer 1), vedoucí k tvorbě pórů ve vnější mitochondriální membráně. Skrze tyto póry dochází k uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru mitochondrie, který poté iniciuje tvorbu apoptosomu a tím i aktivaci kaspázy-9. Z mitochondrie se při tomto procesu uvolňují mimo jiné i další proapoptotické proteiny, např. Smac (**second mitochondria-derived activator of caspase**) či AIF (apoptosis inducing factor) (* Ola et al, 2011).

Apoptosom sestává ze 7 monomerů proteinu Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) a jeho celková molekulová hmotnost se pohybuje mezi 700 kDa a 1,4 MDa. Apaf-1 je protein spadající do třídy signál přenášejících ATPáz s početnými doménami (signal transduction ATPases with numerous domains = STAND), dále patřících do rodiny AAA+ ATPáz (Lelpe et al, 2004). V buňkách se běžně vyskytuje jako

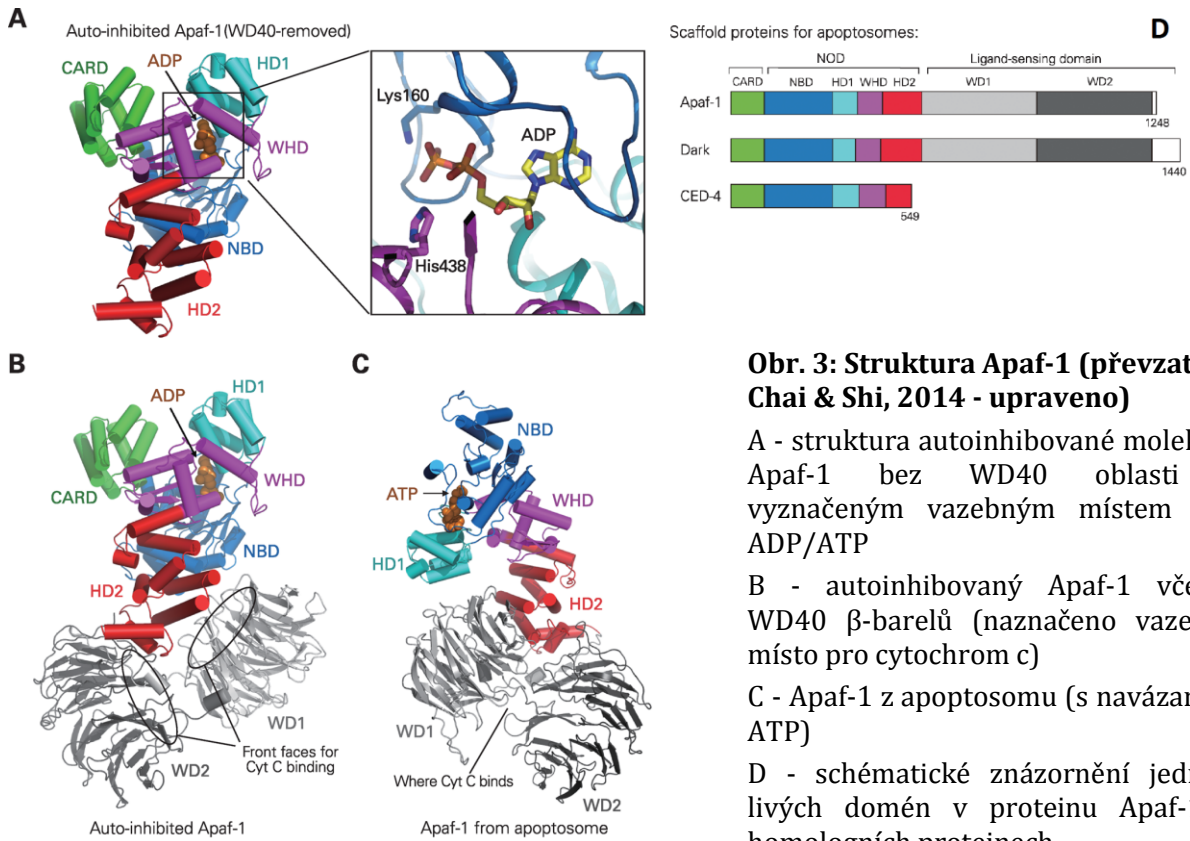
autoinhibovaný monomer (Li et al, 1997). První podmínkou k jeho oligomeraci je uvolnění cytochromu c z mitochondrií, druhou je přítomnost ATP/dATP (Acehan et al, 2002).



Obr. 2: Zjednodušené schéma tvorby apoptosomu a aktivace kaspázy-9 a -3 (převzato z Wurstle et al, 2012) - Cytochrom c uvolněný z mitochondrie umožní vazbu (d)ATP na Apaf-1, ten oligomeruje v heptamerický apoptosom zprostředkující aktivaci prokaspázy-9. Kaspáza-9 navázaná na apoptosom následně aktivuje kaspázu-3. Aktivace efektorové kaspázy-3, stejně jako její aktivita mohou být potlačeny inhibitory apoptózy (IAPs), zejména proteinem XIAP.

Apaf-1 obsahuje 3 funkční domény: N-koncový homotypický interakční motiv, centrální nukleotid vázající oligomerizační doménu (NOD) a C-koncovou s ligandem (cytochrom c) interagující doménu (viz Obr. 3). Homotypický interakční motiv představuje u Apaf-1 CARD doména. NOD se skládá z nukleotid vázící domény (NBD), helikální domény 1 (helical domain 1 - HD1), WH domény (winged-helix domain - WHD) a helikální domény 2 (HD2). NBD a HD1 společně tvoří ATPázovou doménu (Riedl et al, 2005). S ligandem interagující doména obsahuje 15 zhruba 40aminokyselinových repetitivních sekvencí, které dohromady tvoří 2 β -barely - tzv. oblast WD40 repetit.

Jak již napovídá název, NOD je zodpovědná za oligomerizaci Apafu-1 (pomocí svých NBD, HD1 a WHD) a na její NBD je vázán ATP (případně ADP). Cytochrom c se naproti tomu váže mezi β -barely ve WD 40 oblasti (Yuan et al, 2010).



Obr. 3: Struktura Apaf-1 (převzato z Chai & Shi, 2014 - upraveno)

A - struktura autoinhibované molekuly Apaf-1 bez WD40 oblasti s vyznačeným vazebným místem pro ADP/ATP

B - autoinhibovaný Apaf-1 včetně WD40 β -barelů (naznačeno vazebné místo pro cytochrom c)

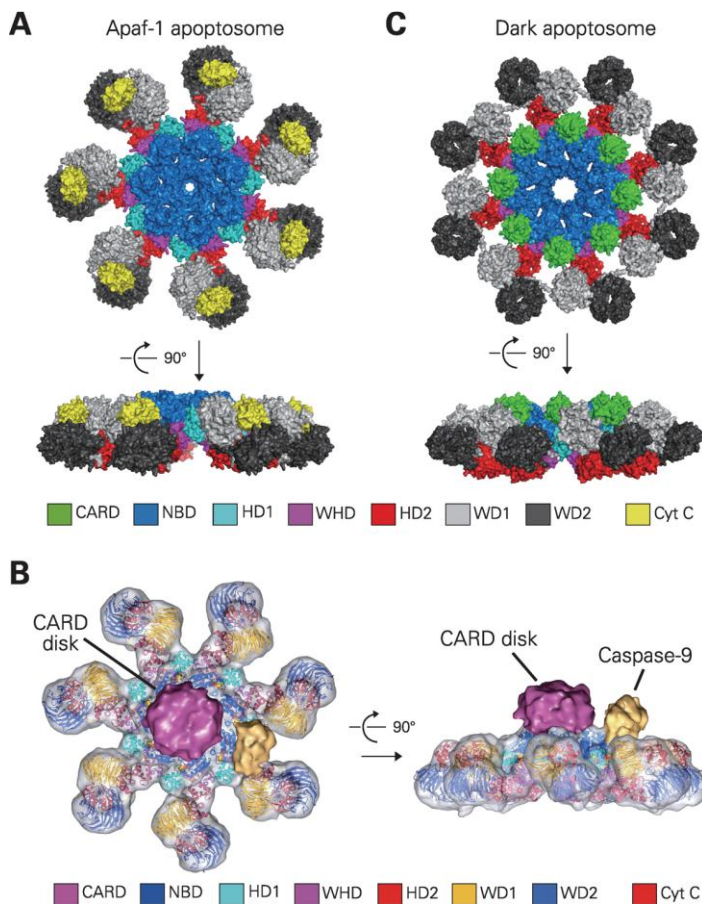
C - Apaf-1 z apoptosomu (s navázaným ATP)

D - schématické znázornění jednotlivých domén v proteinu Apaf-1 a homologních proteinech

Celý apoptosom má tvar kola připomínající koblihu či pneumatiku se 7 vyběhajícími rameny. Centrální část je tvořena NOD, ramena jsou tvořena dvěma β -barely - WD1 a WD2 (jeden je složen ze 7 repetitivních sekvencí, druhý z 8). Významnou roli při udržování tzv. uzavřené konformace má oblast WD40 repetitivní. Tři nabitá AMK 7-repetitivního β -barelu interagují vodíkovými můstky s nabitými zbytky v NBD a HD2 a tím posilují už tak poměrně silné mezi-doménové interakce bránící výměně ADP za ATP (Reubold et al, 2011). Výměna je umožněna až vazbou cytochromu c, která zapříčiní rotaci β 7 barelu a mírný pohyb β 8 barelu a tím jsou tyto interakce narušeny.

CARD je během uzavřené konformace flexibilně navázána na NBD a WHD pomocí 13 vodíkových můstků a je nepřístupná pro interakci s prokaspázou-9. Až po aktivaci apoptosomu a homotypické interakci CARD domény prokaspázy-9 s apoptosomální CARD dochází ke zformování CARD disku asymetricky nad rovinou centrální části apoptosomu (Yuan et al, 2010). Podle některých studií je však molekula Apaf-1 přístupná pro navázání prokaspázy-9 ještě před složením apoptosomu, případně během

jeho skládání. Je možné, že navázání prokaspázy-9 již v této fázi urychluje tvorbu holoapoptosomu (* Yuan & Akey, 2013).



Obr. 4: Savčí apoptosom a apoptosom z *Drosophily* (převzato z Chai & Shi, 2014)

A - vrchní a boční pohled na savčí apoptosom (CARD doména není z vnějšku patrná)

B - Apaf-1 apoptosom po navázání kaspázy-9; CARD disk je mírně vychýlen z centra

C - vrchní a boční pohled na oktamerický Dark apoptosom (cytochrom c není nutný pro složení)

Většina studií uvádí, že v monomerickém stavu je na Apaf-1 navázán ADP (Bao et al, 2007; Reubold et al, 2009). Avšak některé tvrdí, že i v monomeru je vázán dATP a vazba cytochromu spustí jeho hydrolýzu změnou konformace a indukovanou aktivací ATPázové aktivity Apafu-1 (Kim et al, 2005). Podle obou teorií je přítomné či hydrolyzované ADP/dADP následně nahrazeno exogenním ATP/dATP. Tento krok vede k formaci apoptosomu.

Pro tvorbu tzv. miniapoptosomu (apoptosom tvořený ze sedmi molekul Apaf-1 bez WD40 repetice - tzv. Apaf-1ΔC) není nutná přítomnost cytochromu c, dostačující je pouze optimální koncentrace ATP/dATP (Bao et al, 2007). Apoptosom i miniapoptosom vykazují stejnou schopnost aktivace kaspázy-9 (Riedl et al, 2005).

Následně dochází k vazbě prokaspázy-9 a její autokatalytické aktivaci a sestřihu na aktivní kaspázu. Bylo zjištěno, že plně procesovaná kaspáza-9 vázaná na apoptosom

vykazuje o 2-3 řády vyšší proteázovou aktivitu, než volná, k apoptosomu nevázaná kaspáza-9 (Rodriguez & Lazebnik, 1999). To dalo za vznik holoenzymatické koncepci, podle níž je hlavní úlohou apoptosomu stimulace aktivity kaspázy.

Na tuto teorii v podstatě navazuje jiná, tzv. teorie „molekulárního časovače“. Oproti předchozí zmíněné studii bylo prokázáno, že i neprocesovaná prokaspáza-9 vázaná na apoptosom vykazuje vysokou proteolytickou aktivitu (dokázáno na příkladu nesestřihnutelné varianty prokaspázy-9 - ProC9-TM). Jelikož prokaspáza-9 má vyšší afinitu k apoptosomu, než procesovaná kaspáza-9, autokatalytický sestřih prokaspázy-9 v důsledku vede k ukončení její proteolytické aktivity - kaspáza-9 je vytěsněna novou prokaspázou. Tento jev pravděpodobně funguje jako obrana proti nechtěné aktivaci apoptózy. Na intracelulární koncentraci prokaspázy-9 záleží, zda po disociaci původní kaspázy-9 od apoptosomu dojde k navázání nové prokaspázy a zda dojde ke znovuspuštění „časovače“ (Malladi et al, 2009).

Co se týče stechiometrie Apaf-1:prokaspáza-9, zdá se, že prvotní teorie o poměru 1:1 je mylná. Podle výsledků studie Yuan et al. z roku 2011 je tento poměr 1:0,8, tedy na jeden apoptosom se váže 5-7 molekul prokaspázy-9, z čehož pouze jedna může být v danou chvíli plně aktivována (Yuan et al, 2011a). Ve výše zmíněné studii Malladi et al. byl taktéž odhalen značný nepoměr v molárních množstvích Apaf-1 a prokaspázy-9 potřebných pro tvorbu plně saturovaného apoptosomu. Za spotřeby 300 nM Apaf-1 stačilo k plné saturaci pouze 50-75 nM prokaspázy-9, což by znamenalo dokonce pouze 1-2 molekuly prokaspázy na apoptosom (Malladi et al, 2009).

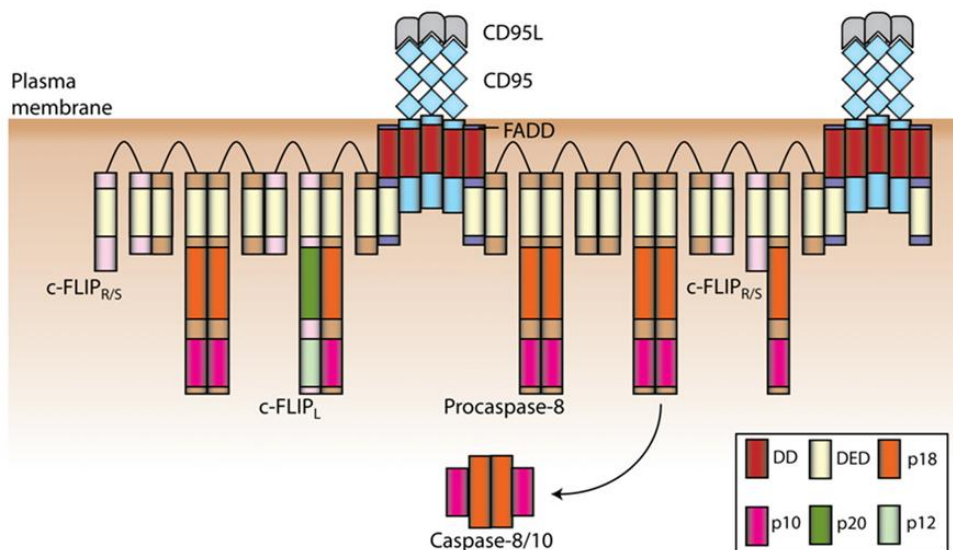
Navzdory četným výzkumům zůstává mnoho aspektů přesného mechanismu aktivace kaspázy-9 na apoptosomu z velké části neobjasněno (* Chai & Shi, 2014).

2.2. Kaspázy-8 a -10 jejich aktivace DISCem

Prokaspázy-8 a -10 se v cytosolu vyskytují jako neaktivní monomery s dvěma N-koncovými DED doménami. Společně zajišťují aktivaci tzv. vnější apoptotické dráhy, tedy dráhy iniciované vazbou ligandů smrti na receptory smrti (death receptor - DR) na cytoplasmatické membráně. Mezi lidské receptory smrti patří TNF (tumor necrosis factor) receptor-1, CD95 (zvaný též Fas, případně APO-1), DR3 (death receptor 3), TRAIL-R1 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-1; též DR4), TRAIL-R2 (též

DR5) a DR6 (Ashkenazi & Dixit, 1998; Benschop et al, 2009). Všechny zmíněné jsou členy rodiny TNFR proteinů. Po vazbě příslušných ligandů na tyto receptory dochází k jejich oligomeraci (pravděpodobně trimerizaci) a na jejich intracelulární domény obsahující DD (death domain) se prostřednictvím své DD homotypicky váží adaptorové proteiny.

V případě Fas/CD95 a TRAIL-R1/R2 se jedná o adaptorový protein FADD (Fas-associated protein with death domain). Tento protein obsahuje na svém N-konci mimo jiné i DED, na kterou se váže DED prokaspázy-8 (příp. prokaspázy-10). Celý nově vzniklý multiproteinový komplex se nazývá DISC (signalizační komplex způsobující smrt = death-inducing signaling complex). DISC indukuje dimerizaci, autokatalytický sestřih a následnou aktivaci prokaspáz-8 a -10 (Hughes et al, 2009).



Obr. 5: Schématická struktura komplexu DISC (převzato z Schleich et al, 2012 - upraveno)

Po interakci trimerického CD95 ligandu s trimerem receptoru CD95 dojde k vazbě FADD na DD receptoru a zformování aktivního DISCu. Na ten se postupně váží DED-pouze proteiny (především prokaspáza-8) a dochází k tvorbě DED řetězce. Délka řetězce je regulována tvorbou můstků mezi sousedními receptory smrti.

Dříve se předpokládalo, že trimerický ligand se váže na trimer DR, který na sebe připoutá 3 molekuly FADD a ty následně každý po jedné prokaspáze (Weber & Vincenz, 2001). Roku 2003 však byla zveřejněna studie popírající tuto teorii a tvrdící, že pro aktivaci receptorů smrti je potřeba hexamerický ligand. Při pokusech s trimerickým FasL a fúzovaným hexamerickým FasL se oba stejně úspěšně vázaly na Fas receptor,

nicméně pouze hexamerický úspěšně indukoval tvorbu DISC a následnou apoptózu (Holler et al, 2003).

O sedm let později se další studie zaměřila na stechiometrický poměr mezi Fas a FADD v DISC. Pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie lidských hFas-hFADD komplexů a následně komplexů, kde byl použit myší Fas a lidský FADD (tedy mFas-hFADD), bylo zjištěno, že tento poměr se pohybuje v rozmezí 5-7 Fas:5 FADD s tím, že nejčastější je poměr 5:5 (Wang et al, 2010).

V roce 2012 však dvě vědecké skupiny nezávisle na sobě prokázaly, že poměr mezi receptorem, FADD a DED-pouze proteiny (prokaspázy-8 a -10 nebo c-FLIP - více viz. kapitola 3.3.3.) zdaleka neodpovídá běžně uznávanému 1:1:1. V případě TRAIL DISCu byl tento poměr určen jako 3:1:4. Při použití kvantitativní hmotnostní spektrometrie byl poměr mezi FADD a DED-pouze proteiny dokonce 1:9 (Dickens et al, 2012). V případě CD95 DISCu bylo zjištěno, že množství DED-pouze proteinů až 5x převyšuje množství FADD (Schleich et al, 2012).

Tato zjištění neodmyslitelně vedla k otázce, jak je možné, aby bylo tolik DED-pouze proteinů navázáno na jediné molekule FADD. Jelikož prokaspáza-8 i -10 obsahují dvě DED, z nichž každá zahrnuje fenylalanin/leucin hydrofobní motiv a vazebnou „kapsu“, které společně umožňují vzájemnou vazbu DED domén, z výše uvedených studií vyplývá, že prokaspázy-8/-10 se pomocí DED1 váží na FADD a na jejich DED2 se následně může napojit další prokaspáza (případně protein c-FLIP). Dochází tak k tvorbě DED řetězce, který umožňuje blízkostí indukovanou antiparalelní dimerizaci kaspázních katalytických podjednotek. Aktivní dimery (resp. heterotetramery p18₂-p10₂) kaspáz se tedy tvoří podél tohoto řetězce (Dickens et al, 2012). Během aktivace kaspázy-8 je nejprve naštěpena spojka mezi velkou a malou podjednotkou a následně oddělena prodoména - tím je aktivní kaspáza uvolněna z řetězce (Chang et al, 2003).

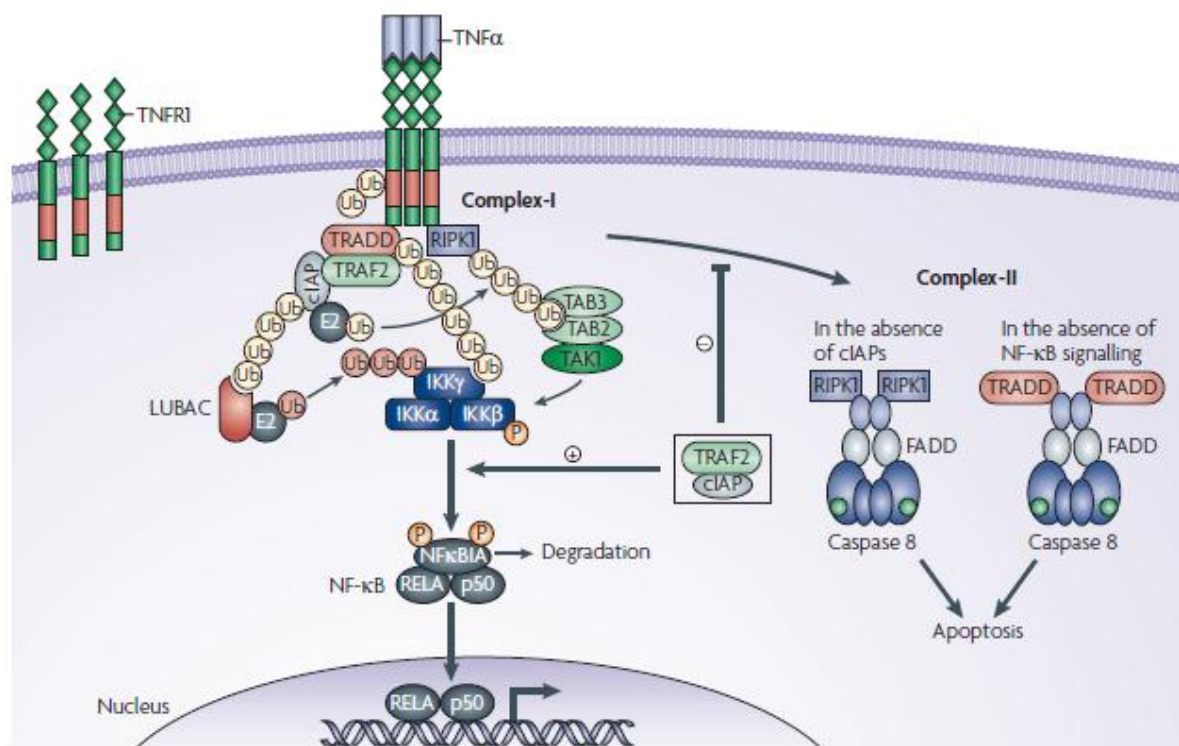
Nenaštěpená prokaspáza-8 vázaná na DISC je katalyticky aktivní, vykazuje nicméně striktní substrátovou specifitu - je schopná štěpit pouze další prokaspázy-8, případně c-FLIP. Dochází tak k amplifikaci signálu (Hughes et al, 2009).

Pro plnou aktivaci prokaspázy-8 je optimální délkou DED-řetězce 2 až 8 molekul DED proteinů na jeden receptor. Délka řetězce je ovlivněná především silou stimulace receptoru. Překvapivě bylo zjištěno, že silnější signál znamená kratší řetězec a naopak. Je to nicméně vyváženo faktem, že při slabší stimulaci vznikne menší počet DISC komplexů (Schleich et al, 2012). Dalším faktorem ovlivňujícím délku řetězce je omezený

počet molekul prokaspáz v buňce (je nepravděpodobné, že by vznikl řetězec delší než 10 molekul DED-pouze proteinů) a tvorba můstků mezi sousedícími receptory. To je obranou proti spuštění apoptózy i při stimulaci jen několika receptorů.

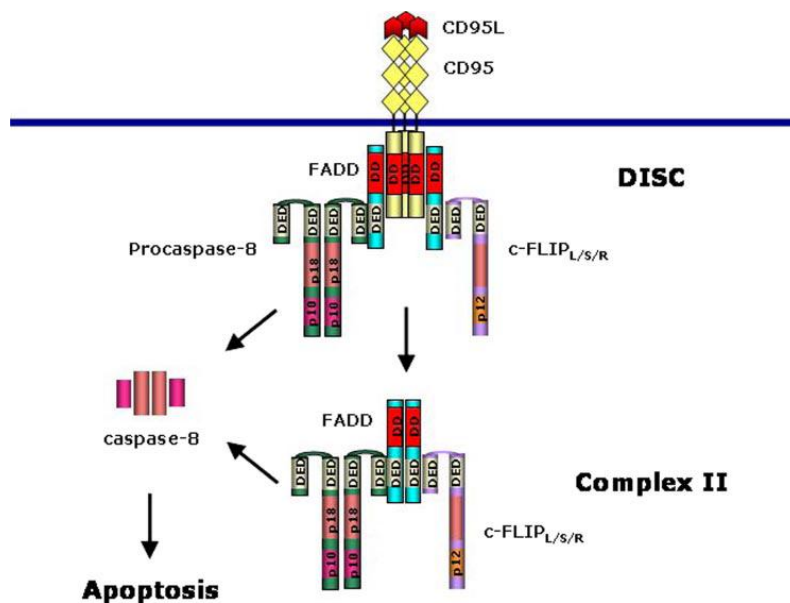
Při slabší síle stimulačního signálu také došlo k častějšímu výskytu inhibičního proteinu c-FLIP v řetězci, což je dáno jeho vyšší afinitou v porovnání s prokaspázou-8 (Schleich et al, 2012).

Stimulace TNFR1 vede k tvorbě odlišného komplexu. Adaptorovým proteinem je v tomto případě TRADD, který umožňuje vazbu dalších adaptorových proteinů (TRAF2, RIP1, cIAP1,...). Tento komplex (komplex I) vede především k aktivaci antiapoptotických transkripčních faktorů NF- κ B a AP-1 (Micheau & Tschopp, 2003). Nicméně po nějaké době dochází k endocytóze komplexu I (Schneider-Brachert et al, 2004) a tvorbě sekundárních proapoptotických komplexů (komplexy IIA a IIB). Oba tyto komplexy obsahují FADD a (pokud nejsou inhibovány c-FLIPem - komplex IIA, případně cIAPs a ubiquitinací proteinu RIP1 - komplex IIB) jsou stejně jako DISC schopny aktivovat prokaspázu-8 (Wang et al, 2008). Komplex IIB se také nazývá ripoptosom a jeho další funkcí je spouštění nekroptózy.



Obr. 6: Schématické znázornění komplexů I a IIA a IIB vzniklých stimulací TNFR1 (převzato z Gyrd-Hansen & Meier, 2010) - Po endocytóze komplexu I dochází ke změně adaptorových proteinů a vytvoření komplexů IIA (první zprava) a IIB (druhý zprava).

Tvorba sekundárního cytoplasmatického signalizačního komplexu aktivujícího kaspázu-8 byla popsána i při signalizaci Fas/CD95 receptorem. Tento sekundární komplex se stejně jako DISC skládá z FADD a DED-pouze proteinů, nikoliv však z CD95. Zatímco k aktivaci kaspázy-8 DISCem dochází již pár vteřin po přijetí signálu a množství aktivního DISCu do hodiny výrazně klesá (Golks et al, 2006b), k aktivaci kaspázy-8 v komplexu II dochází i několik hodin po přijetí signálu (Lavrik et al, 2008). Z toho plyne, že komplex II se tvoří krátce po zformování DISCu, nicméně jeho přítomnost přetrvává i po několika hodinách. Hlavní úlohou komplexu II je pravděpodobně aktivace kaspázy-8 a amplifikace proapoptotického signálu.



Obr. 7: Schéma tvorby komplexu II po stimulaci CD95 receptoru (převzato z Lavrik et al, 2008) - Po stimulaci CD95 dochází k tvorbě DISCu a následné formaci cytosolického komplexu II - ten se skládá z FADD a DED-pouze proteinů. Kaspáza-8 je aktivovaná jak DISCem, tak komplexem II.

Apoptotická dráha indukovaná aktivací Fas/CD95 či proapoptotických receptorů pro ligand TRAIL může být v různých typech buněk poněkud odlišně aktivována. Typ buněk I, mezi něž patří např. aktivované T-lymfocyty, je typický velkým množstvím DISCů a molekul aktivní kaspázy-8. V těchto buňkách štěpí kaspáza-8 přímo efektorové kaspázy-3 a -7 a může tak přímo indukovat apoptózu. Naopak v buňkách typu II je méně DISCů a tím i méně aktivní kaspázy-8. Pro účinnou apoptotickou signalizaci je tedy potřeba signál amplifikovat. Toho je docíleno naštěpením proteinu Bid (člen Bcl-2 rodiny ze skupiny BH3-only proteinů) kaspázou-8. Takto aktivovaný zkrácený Bid (tBid =

truncated Bid) se pak nepřímo (inhibice antiapoptotických Bcl-2 proteinů) i přímo (koaktivace pro-apoptotického proteinu Bax) spolupodílí na uvolnění cytochromu c z mitochondrie a následné apoptosomem zprostředkované aktivaci kaspázy-9 (Scaffidi et al, 1998).

Stimulace receptorů smrti a aktivace kaspázy-8 ale nevedou nutně pouze k apoptóze. Tímto mechanismem jsou spouštěny i mnohé neapoptotické procesy jako růst a regenerace nervů (Desbarats et al, 2003), buněčné přežívání indukované NK- κ B transkripčním faktorem (Neumann et al, 2010), diferenciace makrofágů (Rebe et al, 2007) a další. Kaspáza-8 a FADD jsou mimo jiné potřebné pro inhibici nekroptózy ve vyvíjejících se T-buňkách (Ch'en et al, 2011). Přesné mechanismy těchto dějů jsou zatím ze značné části neobjasněny. Jednou z možností, jak regulovat, zda dojde k apoptóze či přežívání, je například typ ligandu CD95 - pokud je CD95L membránově vázaný, spouští apoptózu, pokud je rozpustný, podněcuje autoimunitu a tvorbu nádorů (Reilly et al, 2009).

Kaspáza-8 a kaspáza-10 sdílejí výraznou strukturní i funkční podobnost. Již dlouhou dobu se vedou spory o tom, do jaké míry jsou tyto kaspázy vzájemně zástupné. Podle některých studií je kinetika vazby a aktivace kaspázy-10 na DISC stejná jako u kaspázy-8 a obě kaspázy vykazují stejnou schopnost indukovat apoptózu (Kischkel et al, 2001), podle jiných má nenaštěpená kaspáza-10 schopnost sestřihu Bid a tím proapoptotickou úlohu (na rozdíl od nenaštěpené kaspázy-8, která má velmi úzký okruh substrátů a působí antiapoptoticky) (Wachmann et al, 2010) a dále kaspáza-10 není schopná indukovat apoptózu v kaspáza-8-deficientních buňkách (vice versa to možné je) (Sprick et al, 2002).

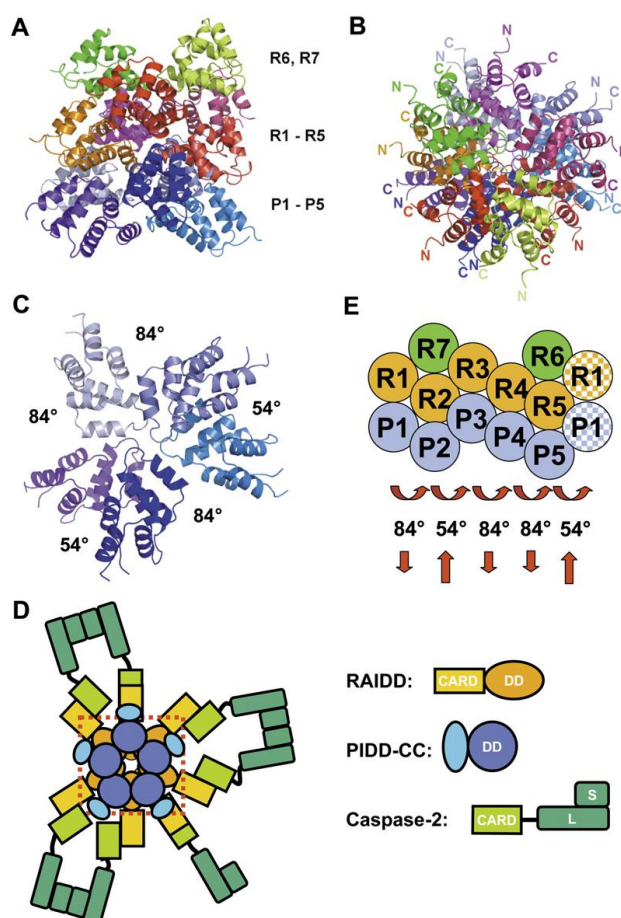
Toto vzájemné srovnání mimo jiné komplikuje fakt, že naše znalosti o kaspáze-10 jsou výrazně menší, než o kaspáze-8. Jedním z důvodů nižšího vědeckého zájmu o kaspázu-10 může být i to, že se nevyskytuje u myši jakožto nejrozšířenějšího savčího modelového organismu.

2.3. Kaspáza-2 a její aktivace PIDDosomem

O fyziologické funkci kaspázy-2 se navzdory jejímu časnému objevu po dlouhou dobu vědělo jen málo. Dnes už víme, že se uplatňuje v mnoha různých buněčných procesech, mimo jiné také v iniciaci apoptózy.

Kaspáza-2 obsahuje jednu CARD doménu, v buňce se vyskytuje jako neaktivní monomer a je aktivována na základě buněčného stresu (v případě kaspázy-2 především na základě teplotního šoku či poškození DNA) komplexem zvaným PIDDosom.

PIDDosom se skládá z pěti molekul proteinu PIDD (p53-induced protein with a DD), tedy proteinu obsahujícího DD, jehož exprese je mimo jiné indukována proteinem p53, a sedmi molekul adaptorového proteinu RAIDD (obsahuje CARD doménu), které vzájemně interagují svými DD. Na tento komplex se následně svými CARD doménami homotypicky váže 7 molekul prokaspázy-2, které jsou aktivovány vzájemným štěpením obdobně, jako prokaspáza-9 (Park et al, 2007).



Obr. 8: Vzájemná poloha DDs v PIDDosomu (převzato z Park et al, 2007)

A - boční pohled na komplex

B - vrchní pohled na komplex

C - vrchní pohled na PIDD-DDs

D - model celého PIDDosomu (DDs jsou v červeném čtverci)

E - schématický planární diagram konstrukce komplexu

Tento způsob aktivace je částečně podmíněn tumor supresorovým proteinem p53, který pozitivně reguluje expresi PIDD (Baptiste-Okoh et al, 2008).

Jedním z několika známých substrátů aktivní kaspázy-2 je i protein Bid (stejně jako u kaspázy-8 v buňkách typu II), jehož sestřižená forma tBid se podílí na uvolňování cytochromu c z mitochondrií (Guo et al, 2002).

Některé studie nicméně ukazují, že pravděpodobně existují i alternativní cesty aktivace kaspázy-2 bez použití PIDDosomu (Manzl et al, 2009).

Prokaspáza-2 byla také potvrzena jako jeden ze substrátů kaspázy-3, je tedy možné, že její úlohou je i tvorba proapoptotické amplifikační smyčky (Paroni et al, 2001).

3. REGULACE EXPRESE A AKTIVITY SAVČÍCH INICIAČNÍCH KASPÁZ

Jak již bylo zmíněno, regulace aktivity proapoptotických kaspáz hraje vysoce důležitou roli v zachování homeostázy organismu, správném vývoji jedince a vzato do důsledků, v podstatě i v zajištění jeho přežití. Možností, jak regulovat hladinu a aktivaci/aktivitu iniciačních kaspáz je hned několik - od regulace transkripce, přes různé posttranslační modifikace a proteinové interakce, až po zajištění jejich degradace.

Není v možnostech této práce zmínit veškeré doposud získané poznatky o regulaci funkce iniciačních kaspáz, a tak v následujících kapitolách jsou uvedeny nejčastější a nejdůležitější mechanismy regulace aktivace či aktivity iniciačních kaspáz.

3.1. Transkripční regulace

Alternativním sestřihem může vznikat tzv. kaspáza-8L, která oproti klasické kaspáze-8 postrádá C-koncovou část katalytické domény - je tedy katalyticky neaktivní. Tato isoforma je schopná i v malých koncentracích kompetitivně inhibovat vazbu kaspázy-8 na FADD a tím blokovat Fas-indukovanou apoptózu (Himeji et al, 2002).

Stejně tak i u kaspázy-9 můžeme pozorovat alternativní sestřih. Zatímco isoforma kaspáza-9a je proapoptotická, kaspáza-9b je kratší o 4 exony a působí antiapoptoticky (Srinivasula et al, 1999).

V mnoha typech dětských nádorů (např. v neuroblastomech) byla pozorována hypermetylace genu kaspázy-8, což vede ke snížení exprese či úplnému potlačení exprese tohoto proteinu (Harada et al, 2002).

3.2. Posttranslační modifikace

3.2.1. Fosforylace

V kaspáze-9 bylo zjištěno hned několik aminokyselin (Ser99, Thr125, Ser144, Ser183, Ser196 a další) vhodných k fosforylaci, stejně tak i v kaspáze-8 (Thr263, Ser364, Ser387,...). Fosforylace většiny z nich vede ke snížení aktivity těchto kaspáz, případně k zablokování jejich sestřihu.

Fosforylace na Thr125 byla několikrát potvrzena jako faktor negativně ovlivňující aktivaci prokaspázy-9, přesný molekulární princip však nebyl dosud objasněn (* Allan &

Clarke, 2009). Jisté je, že k této fosforylaci dochází např. díky CDK1-cyklin B1, která tak zamezuje aktivaci apoptózy během mitózy (Allan & Clarke, 2007). Tato kináza dokáže fosforylovat i prokaspázy-2 (na Ser340) a -8 (na Ser387) a v obou případech inhibuje aktivaci. Zatímco v prokaspáze-2 je fosforylační místo součástí spojky mezi velkou a malou podjednotkou a u prokaspázy-9 součástí spojky mezi prodoménou a velkou podjednotkou, v kaspáze-8 se tato fosforylace odehrává na malé podjednotce zralého enzymu (* Parrish et al, 2013).

Naopak fosforylace Tyr153 v kaspáze-9 v závislosti na poškození DNA se jeví jako signál posilující její aktivitu (Raina et al, 2005).

Fosforylace Ser135 kaspázy-2 v oocytech drápatky prostřednictvím calcium/calmodulin-dependentní protein kinázy II (CaMKII) brání navázání prokaspázy-2 na RAIDD a tím její aktivaci (Nutt et al, 2005).

Některá fosforylační místa mohou chybět v kaspázách určitých savců (např. Ser196 v psí kaspáze-9).

Substrate	Kinase/ phosphatase	Sites	+/- ^a	References
Initiator caspases				
Caspase-8	Src, Fyn, Lyn	Tyr380	-	Cursi et al. 2006; Senft et al. 2007; Jia et al. 2008
Caspase-8	Lyn	Tyr465	-	Jia et al. 2008
Caspase-8	p38 MAPK	Ser364	-	Alvarado-Kristensson et al. 2004
Caspase-8	CDK1	Ser387	-	Matthess et al. 2010
Caspase-8	RSK2	Thr263	+	Peng et al. 2011
Caspase-9	Erk1/2	Thr125	-	Allan et al. 2003
Caspase-9	CDK1	Thr125	-	Allan and Clarke 2007
Caspase-9	DYRK1A	Thr125	-	Seifert et al. 2008
Caspase-9	p38 α	Thr125	-	Seifert and Clarke 2009
Caspase-9	PP1 α	Thr125	-	Dessauge et al. 2006
Caspase-9	PKC ζ	Ser144	-	Brady et al. 2005
Caspase-9	c-Abl	Tyr153	+	Raina et al. 2005
Caspase-9	PKA	Ser99, Ser183, Ser195	Unclear	Martin et al. 2005
Caspase-9	Akt	Ser196 (human)	-	Cardone et al. 1998
Caspase-9	CK2	Ser348 (mouse)	-	McDonnell et al. 2008
Caspase-2	CDK1	Ser340	-	Andersen et al. 2009
Caspase-2	CK2	Ser157	-	Shin et al. 2005
Caspase-2	CaMKII	Ser135 (Xenopus)	-	Nutt et al. 2005
Dronc	CaMKII	Ser130	-	Yang et al. 2010

Tab. 1: Regulace iniciačních kaspáz prostřednictvím fosforylace (převzato z Parrish et al, 2013 - upraveno) V tabulce jsou uvedeny kinázy fosforylující vyznačené aminokyseliny a negativní (-) či pozitivní (+) vliv těchto fosforylací na aktivitu uvedených kaspáz.

3.2.2. Ubiquitinace

Ubiquitinace obvykle slouží jako označení proteinu k degradaci, prostředek k ovlivnění jeho aktivity či má vliv na protein-proteinové interakce.

Nejinak je tomu u ubiquitinace kaspáz, která ve většině případů slouží k inhibici jejich aktivity. Hlavními zprostředkovateli ubiquitinace kaspáz jsou IAPs (inhibitory apoptózy - více viz. kapitola 3.3.1.). U těch byla prokázána schopnost vázat ubiquitin na savčí kaspázy-9, -7 a -3 a dále na kaspázu Dronc z octomilky. Ve všech zmíněných kaspázách vede tato modifikace ke snížení jejich aktivity. Více informací viz. kapitola 3.3.1.

V porovnání s tím se ukázalo, že ubiquitinace kaspázy-8 vázané na DISC culin-3 E3 ligázou naopak způsobuje tvorbu větších agregátů aktivní kaspázy-8 (za přispění proteinu p62) a posílení její aktivity - pravděpodobně díky stabilizaci dimerů a multimerizaci. Deubiquitinační enzym A20 naopak inhibuje aktivitu kaspázy-8 (Jin et al, 2009).

3.2.3. Nitrosylace

Další z možných modifikací kaspázy-9 je i nitrosylace, ke které dochází za vysoké intracelulární koncentrace NO, indukované např. chronických zánětem. Nitrosylace vede k inhibici aktivace kaspázy-9 a tím potencionálně ke vzniku rakoviny (Torok et al, 2002).

Obdobně i S-nitrosylace kaspázy-8 v průběhu TNF- α -indukované apoptózy v hepatocytech inhibuje její aktivitu (Kim et al, 2000).

Na druhou stranu je nutno podotknout, že u oxidu dusnatého byl prokázán i nemalý vliv na indukci apoptózy v určitých tkáních. Zda bude vliv NO na apoptózu pozitivní či negativní tedy závisí na mnoha faktorech (* Razavi et al, 2005).

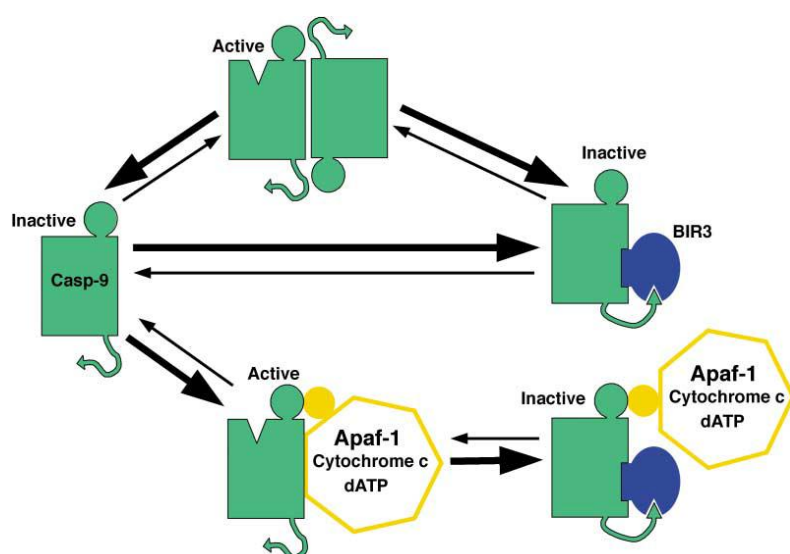
3.3. Protein-proteinové interakce

3.3.1. IAPs

Inhibitory apoptózy (IAPs) jsou proteiny, obsahující zhruba 70 bakulovirálních IAP repetit o délce cca 80 AMK, sdružených do tzv. BIR domény, které inhibují kaspázy, především kaspázy-9, -7 a -3. Počet BIR domén se pohybuje mezi 1-3 a většina těchto proteinů obsahuje také tzv. RING doménu, která má funkci E3 ubiquitin ligázy. BIR doména je charakteristická výskytem tří cysteinů a jednoho histidinu, které společně

váží atom zinku, RING doména obsahuje 6-7 Cys, 1-2 His a 2 atomy zinku. Nejznámější savčí IAPs (XIAP, c-IAP1, c-IAP2) obsahují po třech BIR doménách a RING doménu (* Srinivasula & Ashwell, 2008).

BIR3 doména XIAP se váže na část molekuly kaspázy-9 určené k homooligomeraci a tím fyzicky blokuje dimerizaci kaspázy-9 (Shiozaki et al, 2003). Přestože dříve se myslelo, že XIAP je jediný člen savčí IAP rodiny schopný přímou vazbou inhibovat aktivitu kaspáz (* Eckelman et al, 2006), bylo prokázáno, že přímé inhibice holoenzymu kaspázy-9 na apoptosomu je schopný i c-IAP1 (Burke et al, 2010). Přesný mechanismus však není objasněn.



Obr. 9: Schématický diagram aktivace kaspázy-9 a její inhibice pomocí XIAP (převzato z Shiozaki et al, 2003) - Kaspáza-9 je aktivní pouze jako dimer či vázaná na apoptosom. XIAP (znázorněn modře) může svou vazbou zablokovat homooligomerační místo kaspázy-9 a tím ji inaktivovat.

Dalším mechanismem inhibice kaspáz prostřednictvím IAPs je ubiquitinace (díky RING doméně). Ta v některých případech vede přímo k degradaci kaspázy, v jiných pouze k její inaktivaci (blokováním katalytického místa). Tento princip je poměrně dobře popsán zejména u kaspázy Dronc v *Drosophila* (Wilson et al, 2002).

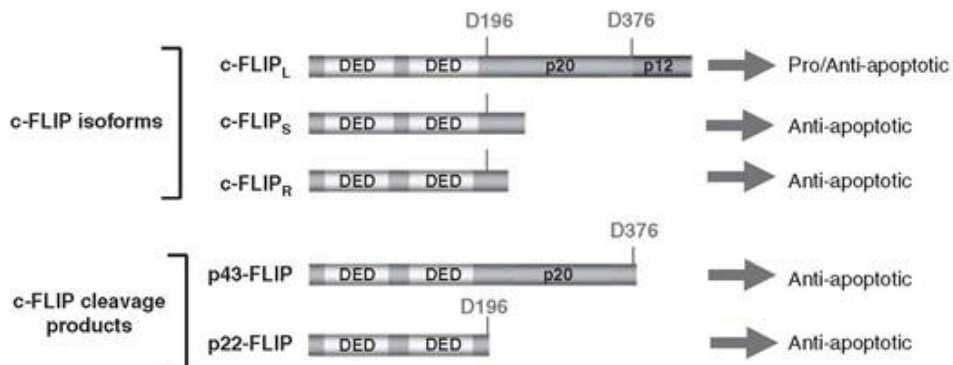
Aktivita IAPs je regulována proteiny ze skupiny IAP antagonistů, např. proteiny Smac/DIABLO a Omi/HtrA2. Oba tyto proteiny obsahují tzv. IBM motiv (IAP-binding motif), který je po translaci kryt mitochondriální cílovou sekvencí. Po translokaci do mitochondrie je cílová sekvence odstraněna a IBM je tak odhalena. Pomocí IBM se tyto proteiny po uvolnění z mitochondrie vážají na BIR domény IAPs a inhibují jejich aktivitu -

za prvé fyzicky brání navázání jiného substrátu a za druhé indukují autoubiquitinaci a následnou degradaci IAPs. Smac/DIABLO tvoří dimery, díky nimž je výsledný vazebný poměr na XIAP 2:1. Tento fakt usnadňuje současnou vazbu na BIR2 i BIR3 (Huang et al, 2003).

S XIAP interaguje i další proapoptotický protein uvolňovaný z mitochondrie - AIF (apoptosis inducing factor) a to i navzdory tomu, že neobsahuje IBM (Wilkinson et al, 2008).

3.3.2. c-FLIP

Cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP), tedy inhibiční protein podobný kaspáze-8 (dříve zvaná FLICE), je jedním z inhibitorů DR-indukované apoptózy. Poprvé byl popsán roku 1997 jako inhibitor aktivace prokaspázy-8 na všech tehdy známých DR (Irmeler et al, 1997). Doposud byly charakterizovány 3 jeho isoformy (S - short, L - long, R - Raji), vznikající díky alternativnímu sestřihu, a dva štěpné produkty. Všechny molekuly c-FLIP obsahují, stejně jako prokaspázy-8 a -10, dvě DED.



Obr. 10: Tři isoformy c-FLIPu a dva jeho štěpné produkty (převzato z Lavrik & Krammer, 2012)

c-FLIP_S a c-FLIP_R oba fungují jako inhibitory sestřihu prokaspázy-8 na multiproteinových komplexech (Golks et al, 2005). Úloha c-FLIP_L v apoptotické dráze je poněkud komplikovanější. Stejně jako předchozí dvě isoformy se prostřednictvím své DED váže na aktivační proteinové komplexy, nicméně za fyziologické koncentrace tvoří s prokaspázou-8 heterodimery usnadňující její aktivaci. Za zvýšené koncentrace však umožní pouze částečný sestřih prokaspázy-8 (na p43/p10 fragmenty), znamenající neschopnost jejího oddělení od DISC_u, zajištění plné aktivace a spuštění apoptózy. Tento jev můžeme pozorovat v některých typech buněk (makrofágy) a určitých typech nádorů.

Za velmi vysoké koncentrace je c-FLIP_L schopen spustit buněčnou smrt i bez pomoci DR, pravděpodobně přímou interakcí s prokaspázou-8 (Chang et al, 2002).

p22-FLIP a p43-FLIP jsou N-terminální produkty po štěpení c-FLIPu prokaspázou-8. p22-FLIP je tvořen v cytosolu nezávisle na DR a v buňce má antiapoptotickou roli (Golks et al, 2006a). p43-FLIP vzniká na DISCu, blokuje aktivaci kaspázy-8 a spouští NF-κB signální dráhu (Kataoka & Tschopp, 2004).

c-FLIP a kaspáza-8 se oba účastní jak proapoptotické, tak antiapoptotické signální dráhy a oba kompetují o stejný CD95 receptor. Zda dojde k apoptóze či nikoliv tedy závisí na poměru množství štěpných produktů z prokaspázy-8 a c-FLIPu.

3.3.3. Bcl-2 proteiny

Ačkoli Bcl-2 proteiny neinteragují přímo s kaspázami, různými mechanismy výrazně ovlivňují jejich aktivaci.

Členy Bcl-2 rodiny proteinů můžeme rozdělit na proapoptotické a antiapoptotické. Všechny tyto proteiny obsahují jednu nebo více Bcl-2 homologických domén (BH domén). Většina antiapoptotických proteinů (např. Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) z této rodiny obsahuje domény 1-4. Naproti tomu proapoptotické obsahují buď pouze BH3 doménu (tzv. BH3-only proteiny) nebo domény 1-3 (tzv. multidoménné proapoptotické proteiny) - např. Bax, Bak, Bok (* Ola et al, 2011).

BH3-only proteiny (patří sem např. Bim, Bid, Bad) fungují jako jakési hlídky reagující proapoptoticky na buněčný stres - v takovém případě inhibují antiapoptotické Bcl-2 proteiny a tím nepřímou (některé jako tBid či Bim i přímo) aktivují BH3-only proteiny (Bax, Bak). Tyto po aktivaci homo-oligomerují a vytvoří tak póry ve vnější mitochondriální membráně a umožní tak uvolňování cytochromu c, Smac, AIF atd. Pokud Bax není aktivován, vyskytuje se v cytosolu jako monomer. Až během své aktivace translokuje do vnější mitochondriální membrány (Billen et al, 2008). V kontrastu s tím, Bak je její součástí, i pokud je inaktivní (Wei et al, 2000).

Funkcí antiapoptotických Bcl-2 proteinů je blokovat aktivitu BH3-only proteinů, případně zabránit oligomeraci Bak a Bax. Vzájemný poměr proapoptotických a antiapoptotických proteinů z Bcl-2 rodiny je jedním z faktorů, ovlivňujících spuštění apoptózy.

3.3.4. Heat shock proteiny

Proteiny teplotního šoku, nebo též stresové proteiny, mají v buňce ochrannou funkci a působí např. jako chaperony umožňující správné sbalení jiných proteinů. Některé z nich jsou exprimovány kontinuálně, jiné pouze při buněčném stresu. Zvýšená exprese Hsp27, Hsp60, Hsp70 a Hsp90 mimo jiné negativně ovlivňuje aktivaci kaspáz, ať už přímo nebo nepřímo (* Lanneau et al, 2008). Obecně se dá říci, že stresové proteiny regulují aktivaci a stabilitu mnoha transkripčních faktorů a kináz, úzce souvisejících s apoptózou.

Hsp27 například indukuje degradaci inhibitoru I- κ B α antiapoptotického NF- κ B faktoru, čímž dojde ke zvýšení exprese Bcl-2 antiapoptotických proteinů a snížení míry apoptózy (Parcellier et al, 2003).

Hsp90 stabilizuje fosforylovanou kinázu Akt, která následně může fosforylovat protein Bad a kaspázu-9 a tím inhibovat jejich aktivitu (Cardone et al, 1998).

Hsp27 a Hsp70 dokáží různými mechanismy zabránit uvolnění cytochromu c, Smac a dalších proapoptotických proteinů z mitochondrie. Hsp70 a Hsp90 mohou vazbou na Apaf-1 zabránit navázání kaspázy-9 na apoptosom a tím zablokovat vnitřní apoptotickou dráhu. Hsp70 je schopný zabránit štěpení Bid na tBid kaspázou-8 (* Lanneau et al, 2008).

Naopak Hsp70 je jedním ze tří proteinů (další dva jsou CAS - cellular apoptosis susceptibility protein a tumor supresivní protein PHAPI), které společně usnadňují formaci apoptosomu. Možným vysvětlením je, že jeden nebo více z těchto proteinů fungují jako nukleotid výměnný faktor usnadňující vazbu dATP na Apaf-1, případně že společně přímo pomáhají skládání apoptosomu (Kim et al, 2008).

3.4. Neproproteinové interakce (ionty, nukleotidy,...)

Nejen proteiny, ale i jednodušší molekuly, v některých případech dokonce pouhé ionty, mohou regulovat aktivitu iniciačních proapoptotických kaspáz. Mezi ně přísluší například změny v nitrobuňčné koncentraci Ca²⁺, KCl či nukleotidů (viz. níže).

3.4.1. Vápník

Ve studii Bao et al. publikované v roce 2007 byl analyzován vliv chloridu vápenatého na aktivaci kaspázy-9 apoptosomem a bylo zjištěno, že v přítomnosti Ca^{2+} iontů byla aktivace kaspázy-9 výrazně inhibována. Při koncentraci 1 μM Ca^{2+} došlo k 35% inhibici aktivace kaspázy-9 (resp. 20% při použití zkrácené verze Apaf-1 ΔC), při koncentraci 1 mM Ca^{2+} byla inhibice 85%, resp. 95%. Naproti tomu při kontrolních experimentech přítomnost chloridu hořečnatého, resp. chloridu manganatého neměla žádný negativní efekt a EDTA, chelátor Ca^{2+} iontů, potlačil negativní efekt 1mM CaCl_2 (Bao et al, 2007).

Koncentrace vápníku v buňkách může běžně dosáhnout desítek až stovek mikromolů. Z toho plyne, že za fyziologických podmínek může vápník výrazně ovlivnit aktivaci kaspázy-9. Bao a další také identifikovali mechanismus vápníkem podmíněné inhibice aktivace kaspázy-9.

Když byl 1 mM CaCl_2 vystaven již sestavený apoptosom (případně miniapoptosom), k žádné inhibici aktivity kaspázy-9 nedošlo. Pokud byl ale 1mM CaCl_2 přidán před sestavením apoptosomu, výrazně inhiboval aktivaci kaspázy-9 a jeho inhibiční vliv tedy souvisí s tvorbou apoptosomu. Pomocí dalších měření bylo následně zjištěno, že tento jev je zapříčiněn přímou vazbou vápníku na Apaf-1 a znemožněním výměny nukleotidů (ATP za ADP, ale např. i dADP za ADP) a tím změny konformace Apafu-1 (Bao et al, 2007).

3.4.2. Draslík

V jiné studii z roku 2001 autoři ukázali, že běžná intracelulární koncentrace draselných iontů inhibuje oligomeraci Apaf-1, a tím i aktivaci kaspázy-9. Avšak přidání exogenního cytochromu c do finální koncentrace 40 μM potlačilo inhibiční působení 50 mM KCl a umožnilo formování apoptosomu a aktivaci kaspázy-9. Exogenní cytochrom c ale nepotlačil inhibiční vliv 150 mM KCl (Cain et al, 2001). Z toho lze odvozovat, že K^+ ionty slouží v buňce jako obrana proti nechtěnému spuštění apoptózy po náhodném uvolnění malého množství cytochromu c. Běžná intracelulární koncentrace K^+ je zhruba 155 mM, avšak v průběhu apoptózy poklesne až na zhruba 70 mM (Bortner et al, 1997).

O šest let později jiný výzkum potvrdil inhibiční efekt K^+ iontů, nicméně podobný efekt prokázal i při nahrazení draselných iontů sodnými. Otevírá se tak možnost, že nejde o specifický efekt K^+ iontů, jako spíš o iontovou sílu cytosolu. Avšak vzhledem

k faktu, že draselné kationty jsou hlavními *in vivo* intracelulárními ionty, nemění toto zjištění nic na jejich důležité regulační funkci během apoptózy (Karki et al, 2007).

3.4.3. Nukleotidy

Běžná cytosolická koncentrace ATP je zhruba 1-5 mM. Při experimentech zkoumajících tvorbu apoptosomu a aktivaci kaspázy-9 však bylo zjištěno, že při fyziologické koncentraci ATP nedocházelo k úspěšné aktivaci kaspázy-9. Naproti tomu, pokud byla tato koncentrace snížena na 0,2-0,3 mM, došlo k aktivaci kaspázy-9. Další snižování koncentrace vedlo k zastavení aktivace, což značí, že alespoň minimální koncentrace ATP je nutná (Chereau et al, 2005).

Toto chování je způsobeno vazbou ATP na prokaspázu-9 za vysokých koncentrací ATP v buňce. Po permeabilizaci mitochondriálních membrán a uvolnění cytochromu c je narušena funkce mitochondrií, dochází k úbytku ATP v cytosolu a tím je prokaspáza-9 uvolněna. Tento mechanismus slouží jako obrana proti spuštění apoptózy poškozením třeba jen jedné mitochondrie a uvolněním malého určitého množství cytochromu c (Chereau et al, 2005).

Podle jiné studie jsou nukleotidy schopny vazby na cytochrom c díky svému zápornému náboji a tím je cytochrom c blokován pro vazbu na Apaf-1 (Chandra et al, 2006).

Zdá se, že nedostatek ATP taktéž inhibuje sestřih prokaspázy-9 vázané na apoptosom ve zralou kaspázu. Přesný molekulární princip však není objasněn (Zhang et al, 2011).

4. AKTIVACE A REGULACE INICIAČNÍCH KASPÁZ V BUŇKÁCH BEZOBRTLÝCH ŽIVOČICHŮ

Aktivace apoptózy je poměrně evolučně konzervovaná a důležitá pro život mnohobuněčných organismů a tudíž lze i u bezobratlých živočichů identifikovat složky a mechanismy, podobné aktivaci apoptózy v lidských buňkách. Základní aktivační schéma (proapoptotický signál zajistí prostřednictvím multiproteinového komplexu aktivaci iniciační kaspázy, ta aktivuje efektorovou kaspázu či kaspázy, které následně štěpí důležité buněčné proteiny a tím spustí apoptózu) je stejné napříč mnoha živočišnými druhy. V následujících odstavcích ve stručnosti nahlédneme na aktivaci a regulaci aktivity iniciačních kaspáz v nejznámějších modelových bezobratlých organismech - octomilce a hád'átku.

4.1. *Drosophila melanogaster* - Dark, Dronc, DIAP1

Ark (nebo také Dark), tedy protein příbuzný savčímu proteinu Apaf-1 (Apaf-1-related killer), vykazuje vysokou strukturní i funkční podobnost s Apaf-1. Za přítomnosti dATP tvoří v buňkách oktamerický apoptosom. Na rozdíl od Apaf-1 ke své aktivaci nepotřebuje cytochrom c a také striktně vyžaduje pouze dATP, nikoliv ATP (Yu et al, 2006). Dark má velmi nízkou ATPázovou aktivitu. Je tedy nepravděpodobné, že někdy dojde k rozštěpení navázaného dATP.

Další odlišností od lidského apoptosomu či apoptosomu v *C. elegans* je, že u *Drosophily* se CARD domény váží z boku na své NBD a tvoří tak jakousi širokou korunu nad centrální diskem (Yuan et al, 2011b).

Stejně jako v lidských buňkách se na CARD váže iniciační kaspáza (Dronc), která je touto vazbou aktivována. Při strukturních studiích bylo zjištěno, že apoptosom *D. melanogaster* někdy spontánně zformuje dvojitý kruhový útvar (dva klasické apoptosomy spojené nad sebou pomocí svých CARD domén) jako důsledek nepřítomnosti Dronc v cytosolu. Předpokládá se, že jednoduchý a dvojitý apoptosom se v buňce vyskytují v dynamické rovnováze v závislosti na koncentraci Dronc (Yuan et al, 2011b).

Vzhledem k omezeným regulačním mechanismům pro skládání apoptosomu a aktivaci Dronc u *Drosophily* se předpokládá, že výraznou roli zde hrají IAPs, především DIAP1. Vazba DIAP1 (E3 ligáza) na prodoménu Dronc působí jednak inhibičně, jednak

iniciuje ubiquitinaci a následnou degradaci Dronc a zabraňuje tak jeho aktivaci (Lee et al, 2011). Velmi významnými regulátory DIAP1 jsou homology lidského proteinu Smac/DIABLO, proteiny Reaper, Hid a Grim. Ty obstarají vytěsnění Dronc z vazebného místa na DIAP1 a dochází tak k uvolnění Dronc (Chai et al, 2003). Dále tyto proteiny zprostředkovávají autoubiquitinaci a degradaci DIAP1 (Yoo et al, 2002).

Úlohou aktivované kaspázy Dronc je aktivace efektorových kaspáz Drice a Dcp-1. DIAP1 taktéž inhibuje aktivitu efektorových kaspáz.

Ačkoli bylo v *Drosophila* objeveno celkem 7 kaspáz, zdá se, že zbylé 4 (Dredd, Strica, Decay a Damm) nehrají v apoptóze výraznou roli (Kornbluth & White, 2005).

4.2. *Caenorhabditis elegans* - CED-4, CED-3

U háďátka můžeme též nalézt podobný princip aktivace iniciační kaspázy, jako u lidské kaspázy-9 a Dronc. Homologem kaspázy-9 je v tomto případě kaspáza CED-3 (cell-death abnormal), která je zároveň jedinou kaspázou vyskytující se u hlístic, homologem Apaf-1 je CED-4.

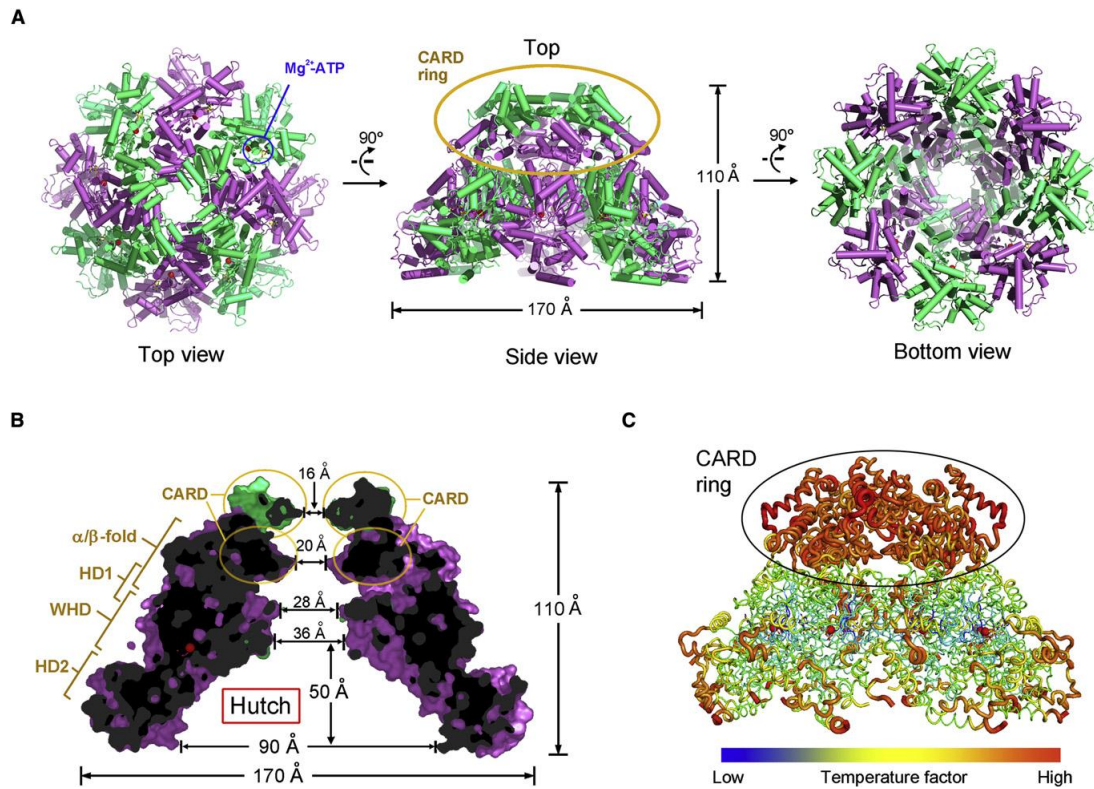
Předpokládá se, že při syntéze monomeru CED-4 se na tento protein ihned váže nukleotid, který je v danou chvíli v buňce v nadbytku. Je-li tímto nukleotidem difosfát, dochází následně k jeho záměně za ATP, což vede k tvorbě tzv. laterálního dimeru (* Yuan & Akey, 2013). V tomto dimeru nejsou oba monomery zcela rovnocenné a dimer tedy vykazuje asymetrii. Pouze monomer CED-4a přímo interaguje s CED-9 (homolog Bcl-2 proteinů), odlišná je i poloha CARD domény v jednotlivých monomerech. V obou monomerech je již navázán ATP (nikoliv dATP), pro následné skládání apoptosomu tedy není nutná výměna nukleotidů (Qi et al, 2010).

Protože CED-4 neobsahuje regulační oblast WD40 (viz. Obr. 3), je regulace jeho oligomerace zajištěna mitochondriálně vázaným proteinem CED-9. Ten se váže na laterální dimer CED-4 a zabraňuje jeho začlenění do apoptosomu (Yan et al, 2005).

Pro uvolnění CED-4 z (CED-4)₂:CED-9 komplexu je nutný protein EGL-1 (egg-laying defective), člen rodiny BH3-pouze proteinů a inhibitor proteinu CED-9. Vazba EGL-1 na CED-9 vede k alosterickému narušení vazeb v komplexu (CED-4)₂:CED-9 a následnému oddělení molekul CED-4 a CED-9 (Yan et al, 2005).

Apoptosom z *Caenorhabditis elegans* je trychtýřovitého tvaru, oktamerický, tvořený osmi monomery (tedy čtyřmi dimery) CED-4 a vykazuje pouze 4-četnou symetrii, jelikož

jeho CARD domény tvoří 2 tetramerické kruhy navršené na sobě. Ve spodním A-kruhu tvoří spojky mezi CARDS a nukleotid vázajícími doménami (NBDs) α -helixy, stejně jako v A monomeru laterálního dimeru CED-4. Naproti tomu ve vrchním B-kruhu jsou tyto spojky relaxovány (* Yuan & Akey, 2013).



Obr. 11: Struktura CED-4 apoptosomu (převzato z Qi et al, 2010)

- A - pohled na oktamerický CED-4 apoptosom (zleva vrchní, boční a spodní pohled)
- B - řez apoptosomem skrz centrální osu - dobře patrný trychtýřovitý tvar
- C - teplotní faktor jednotlivých částí apoptosomu - patrný vysoký teplotní faktor (či B faktor) CARD domén (značící jejich vysokou flexibilitu)

CED-3 se v buňkách vyskytuje převážně jako monomer. Na CED-4 apoptosom se váží pouze 2 molekuly CED-3 (Qi et al, 2010) prostřednictvím svých L2' smyček. Důvodem je omezená velikost vazebného místa na apoptosomu odpovídající právě velikosti dvou monomerů CED-3 (Huang et al, 2013). Stejně jako u kaspázy-9 zajišťuje apoptosom jak autoproteolytické zpracování CED-3, tak tvorbou holoenzymu posiluje její proteázovou aktivitu (Huang et al, 2013; Yan et al, 2005).

5. ZÁVĚR

Iniciační kaspázy jsou proteázy esenciální pro aktivaci kanonické apoptotické signalizace, jejichž struktura a funkce je konzervovaná napříč živočišnými druhy. Na kaspázách závislá apoptóza je pak esenciálním procesem jak pro embryogenezi, tak i pro udržování správné funkce organismu. Dysregulace aktivity iniciačních a efektorových kaspáz může vést k mnoha závažným onemocněním, jako například k rakovině (dětský neuroblastom), neurodegenerativním onemocněním (Alzheimerova choroba) či autoimunitním chorobám.

Jak iniciační, tak i efektorové kaspázy jsou v buňce produkovány jako neaktivní zymogeny, avšak iniciační kaspázy ke své aktivaci vyžadují další adaptorové proteiny, resp. proteinové komplexy složené z jednoho či více různých proteinů. Těmito komplexy jsou především DISC pro kaspázy-8 a -10, apoptosom pro kaspázu-9 a PIDDosom pro kaspázu-2.

V buňce existují dvě hlavní apoptotické dráhy, vnitřní, spouštěná buněčným stresem, v jejíž aktivaci se uplatňuje především kaspáza-9, případně kaspáza-2, a vnější, iniciovaná vazbou ligandů smrti na receptory smrti, jejíž spuštění zajišťuje především kaspáza-8. Obě dráhy podléhají značnému množství regulačních mechanismů, mezi něž patří vazba specifických inhibitorů na některou z komponent aktivačních komplexů, případně přímo na danou (pro)kaspázu, posttranslační modifikace kaspáz či některého z aktivačních proteinů, inhibice aktivace kaspáz v důsledku nedostatečné (nebo naopak příliš vysoké) koncentrace některé ze složek cytosolu či indukce exprese pro- nebo antiapoptotických proteinů.

Navzdory velkému množství informací, doposud získaných o aktivaci a regulaci aktivity iniciačních kaspáz a průběhu apoptózy, zůstává mnoho otázek zatím nezodpovězených. Především zůstávají neobjasněny detailní molekulární principy některých meziproteinových interakcí. Například není známo, jak přesně dochází k aktivaci kaspázy-9 na apoptosomu. Dále dosud není jasné, do jaké míry jsou kaspázy-8 a -10 vzájemně zástupné. Rouškou tajemství je částečně stále zahalena funkce kaspázy-2, stejně tak jako možný alternativní princip její aktivace.

Za laboratorních *in vitro* podmínek se lze jen stěží adekvátně přiblížit podmínkám panujícím v buňce jako součásti organismu a tak výsledky získané *in vitro* nemusí vždy zcela odpovídat situaci *in vivo*. Důsledkem toho je, že různé studie, zabývající se stejným

tématem, si mohou vzájemně protiřečit. Z tohoto důvodu jsou také *in vivo* modely (obratlovci i bezobratlí), zejména jejich cílené genové delece či mutace, nezbytnou součástí a potvrzením či korekcí výsledků z *in vitro* pokusů.

Současný trend ve studiu kaspáz a programované buněčné smrti je neodmyslitelně spjat s možným terapeutickým využitím těchto mechanismů. Bylo již například vyvinuto mnoho syntetických inhibitorů pro různé proteiny účastnící se kaspázové kaskády, z nichž některé vedou k potlačení, jiné k hyperaktivaci apoptózy. Existují také umělé ligandy smrti, vážící se na receptory smrti a indukující tak vznik apoptózy např. v nádorových buňkách. Rozličné potencionální léčebné metody založené na apoptóze jsou v různých fázích klinických testů.

CITOVANÁ LITERATURA

- Acehan D, Jiang XJ, Morgan DG, Heuser JE, Wang XD, Akey CW (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular Cell* **9**: 423-432
- Allan LA, Clarke PR (2007) Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Molecular Cell* **26**: 301-310
- Allan LA, Clarke PR (2009) Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *Febs Journal* **276**: 6063-6073
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan JY (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**: 171-171
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: Signaling and modulation. *Science* **281**: 1305-1308
- Bao Q, Lu W, Rabinowitz JD, Shi Y (2007) Calcium Blocks Formation of Apoptosome by Preventing Nucleotide Exchange in Apaf-1. *Molecular Cell* **25**: 181-192
- Baptiste-Okoh N, Barsotti AM, Prives C (2008) Caspase 2 is both required for p53-mediated apoptosis and downregulated by p53 in a p21-dependent manner. *Cell Cycle* **7**: 1133-1138
- Benschop R, Wei T, Na SQ (2009) Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 21: TNFR-Related Death Receptor-6, DR6. *Therapeutic Targets of the Tnf Superfamily* **647**: 186-194
- Billen LP, Kokoski CL, Lovell JF, Leber B, Andrews DW (2008) Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *Plos Biology* **6**: 1268-1280
- Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci J-E, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS (2003) A Unified Model for Apical Caspase Activation. *Molecular Cell* **11**: 529-541
- Bortner CD, Hughes FM, Cidlowski JA (1997) A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 32436-32442
- Burke SP, Smith L, Smith JB (2010) cIAP1 Cooperatively Inhibits Procaspase-3 Activation by the Caspase-9 Apoptosome. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 30061-30068
- Cain K, Langlais C, Sun XM, Brown DG, Cohen GM (2001) Physiological concentrations of K⁺ inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 41985-41990
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**: 1318-1321
- Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Vanness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, Huebner K, Black RA (1992) MOLECULAR-CLONING OF THE INTERLEUKIN-1-BETA CONVERTING ENZYME. *Science* **256**: 97-100
- Ch'en IL, Tsau JS, Molkentin JD, Komatsu M, Hedrick SM (2011) Mechanisms of necroptosis in T cells. *Journal of Experimental Medicine* **208**: 633-641
- Chai J, Shi Y (2014) Apoptosome and inflammasome: conserved machineries for caspase activation. *National Science Review* **1**: 101-118
- Chai JJ, Yan N, Huh JR, Wu JW, Li WY, Hay BA, Shi YG (2003) Molecular mechanism of Reaper-Grim-Hid-mediated suppression of DIAP1-dependent Dronc ubiquitination. *Nature Structural Biology* **10**: 892-898

- Chandra D, Bratton SB, Person MD, Tian YA, Martin AG, Ayres M, Fearnhead HO, Gandhi V, Tang DG (2006) Intracellular nucleotides act as critical prosurvival factors by binding to cytochrome c and inhibiting apoptosome. *Cell* **125**: 1333-1346
- Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME, Yang XL (2003) Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *Embo Journal* **22**: 4132-4142
- Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang XL (2002) c-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo Journal* **21**: 3704-3714
- Chao Y, Shiozaki EN, Srinivasula SM, Rigotti DJ, Fairman R, Shi YG (2005) Engineering a dimeric caspase-9: A re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *Plos Biology* **3**: 1079-1087
- Chereau D, Zou H, Spada AP, Wu JC (2005) A nucleotide binding site in caspase-9 regulates apoptosome activation. *Biochemistry* **44**: 4971-4976
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2008) Caspases - An update. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **151**: 10-27
- Degterev A, Boyce M, Yuan JY (2003) A decade of caspases. *Oncogene* **22**: 8543-8567
- Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme JS, Newell MK (2003) Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nature Cell Biology* **5**: 118-125
- Dickens LS, Boyd RS, Jukes-Jones R, Hughes MA, Robinson GL, Fairall L, Schwabe JWR, Cain K, MacFarlane M (2012) A Death Effector Domain Chain DISC Model Reveals a Crucial Role for Caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death. *Molecular Cell* **47**: 291-305
- Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL (2006) Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *Embo Reports* **7**: 988-994
- Ellis HM, Horvitz HR (1986) GENETIC-CONTROL OF PROGRAMMED CELL-DEATH IN THE NEMATODE C-ELEGANS. *Cell* **44**: 817-829
- Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN (2005) c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 14507-14513
- Golks A, Brenner D, Krammer PH, Lavrik IN (2006a) The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappa B activation. *Journal of Experimental Medicine* **203**: 1295-1305
- Golks A, Brenner D, Schmitz I, Watzl C, Krueger A, Krammer PH, Lavrik IN (2006b) The role of CAP3 in CD95 signaling: new insights into the mechanism of procaspase-8 activation. *Cell Death and Differentiation* **13**: 489-498
- Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2002) Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 13430-13437
- Gyrd-Hansen M, Meier P (2010) IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappa B, inflammation and cancer. *Nature Reviews Cancer* **10**: 561-574
- Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, Maitra A, Reddy JL, Matta H, Miyajima K, Timmons CF, Tomlinson GE, Mastrangelo D, Hay RJ, Chaudhary PM, Gazdar AF (2002) Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Research* **62**: 5897-5901
- Himeji D, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hayashi K, Watanabe T, Harada M (2002) Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade. *Blood* **99**: 4070-4078
- Ho PK, Hawkins CJ (2005) Mammalian initiator apoptotic caspases. *Febs Journal* **272**: 5436-5453

- Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F, Tinel A, Deperthes D, Calderara S, Schulthess T, Engel J, Schneider P, Tschopp E (2003) Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 1428-1440
- Hu Q, Wu D, Chen W, Yan Z, Shi Y (2013) Proteolytic processing of the caspase-9 zymogen is required for apoptosome-mediated activation of caspase-9. *J Biol Chem* **288**: 15142-15147
- Huang WJ, Jiang TY, Choi WY, Qi SQ, Pang YX, Hu Q, Xu YH, Gong XQ, Jeffrey PD, Wang JW, Shi YG (2013) Mechanistic insights into CED-4-mediated activation of CED-3. *Genes & Development* **27**: 2039-2048
- Huang YH, Rich RL, Myszka DG, Wu H (2003) Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 49517-49522
- Hughes MA, Harper N, Butterworth M, Cain K, Cohen GM, MacFarlane M (2009) Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival. *Mol Cell* **35**: 265-279
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann B, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**: 190-195
- Jin ZY, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, Ashkenazi A (2009) Cullin3-Based Polyubiquitination and p62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling. *Cell* **137**: 721-735
- Karki P, Seong C, Kim JE, Hur K, Shin SY, Lee JS, Cho B, Park IS (2007) Intracellular K⁺ inhibits apoptosis by suppressing the Apaf-1 apoptosome formation and subsequent downstream pathways but not cytochrome c release. *Cell Death and Differentiation* **14**: 2068-2075
- Kataoka T, Tschopp J (2004) N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappa B signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 2627-2636
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) APOPTOSIS - BASIC BIOLOGICAL PHENOMENON WITH WIDE-RANGING IMPLICATIONS IN TISSUE KINETICS. *British Journal of Cancer* **26**: 239-&
- Kim HE, Du FH, Fang M, Wang XD (2005) Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 17545-17550
- Kim HE, Jiang XJ, Du FH, Wang XD (2008) PHAPI, CAS, and Hsp70 promote apoptosome formation by preventing Apaf-1 aggregation and enhancing nucleotide exchange on Apaf-1. *Molecular Cell* **30**: 239-247
- Kim YM, Kim TH, Chung HT, Talanian RV, Yin XM, Billiar TR (2000) Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. *Hepatology* **32**: 770-778
- Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 46639-46646
- Kornbluth S, White K (2005) Apoptosis in Drosophila: neither fish nor fowl (nor man, nor worm). *Journal of Cell Science* **118**: 1779-1787
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MSS, Rakic P, Flavell RA (1998) Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking Caspase 9. *Cell* **94**: 325-337

- Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C (2008) Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **12**: 743-761
- Lavrik IN, Krammer PH (2012) Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death and Differentiation* **19**: 36-41
- Lavrik IN, Mock T, Golks A, Hoffmann JC, Baumann S, Krammer PH (2008) CD95 stimulation results in the formation of a novel death effector domain protein-containing complex. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 26401-26408
- Lee TV, Fan Y, Wang SA, Srivastava M, Broemer M, Meier P, Bergmann A (2011) Drosophila IAP1-Mediated Ubiquitylation Controls Activation of the Initiator Caspase DRONC Independent of Protein Degradation. *Plos Genetics* **7**: 13
- Lelpe DD, Koonin EV, Aravind L (2004) STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: Multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *Journal of Molecular Biology* **343**: 1-28
- 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
- Liu JR, Opipari AW, Tan LJ, Jiang YB, Zhang YJ, Tang HJ, Nunez G (2002) Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: Implications for chemoresistance. *Cancer Research* **62**: 924-931
- MacCorkle RA, Freeman KW, Spencer DM (1998) Synthetic activation of caspases: Artificial death switches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 3655-3660
- Malladi S, Challa-Malladi M, Fearnhead HO, Bratton SB (2009) The Apaf-1-procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer. *Embo Journal* **28**: 1916-1925
- Manzl C, Krumschnabel G, Bock F, Sohm B, Labi V, Baumgartner F, Logette E, Tschopp J, Villunger A (2009) Caspase-2 activation in the absence of PIDDosome formation. *Journal of Cell Biology* **185**: 291-303
- Micheau O, Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**: 181-190
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J (1993) Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* **75**: 653-660
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 2926-2930
- Neumann L, Pforr C, Beaudouin J, Pappa A, Fricker N, Krammer PH, Lavrik IN, Eils R (2010) Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. *Molecular Systems Biology* **6**: 17
- Nutt LK, Margolis SS, Jensen M, Herman CE, Dunphy WG, Rathmell JC, Kornbluth S (2005) Metabolic regulation of oocyte cell death through the CaMKII-mediated phosphorylation of caspase-2. *Cell* **123**: 89-103
- Ola MS, Nawaz M, Ahsan H (2011) Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* **351**: 41-58
- Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantome A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E, Garrido C (2003) HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappa B alpha proteasomal degradation. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 5790-5802

- Park HH, Logette E, Raunser S, Cuenin S, Walz T, Tschopp J, Wu H (2007) Death domain assembly mechanism revealed by crystal structure of the oligomeric PIDDosome core complex. *Cell* **128**: 533-546
- Paroni G, Henderson C, Schneider C, Brancolini C (2001) Caspase-2-induced apoptosis is dependent on caspase-9, but its processing during UV- or tumor necrosis factor-dependent cell death requires caspase-3. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 21907-21915
- Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S (2013) Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**: 24
- Qi SQ, Pang YX, Hu Q, Liu Q, Li H, Zhou YL, He TX, Liang QL, Liu YX, Yuan XQ, Luo GA, Li HL, Wang JW, Yan N, Shi YG (2010) Crystal Structure of the *Caenorhabditis elegans* Apoptosome Reveals an Octameric Assembly of CED-4. *Cell* **141**: 446-457
- Raina D, Pandey P, Ahmad R, Bharti A, Ren J, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D (2005) c-Abl tyrosine kinase regulates caspase-9 autocleavage in the apoptotic response to DNA damage. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 11147-11151
- Razavi HM, Hamilton JA, Feng QP (2005) Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. *Pharmacology & Therapeutics* **106**: 147-162
- Rebe C, Cathelin S, Launay S, Filomenko R, Prevotat L, L'Ollivier C, Gyan E, Micheau O, Grant S, Dubart-Kupperschmitt A, Fontenay M, Solary E (2007) Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappa B in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood* **109**: 1442-1450
- Reilly LAO, Tai L, Lee L, Kruse EA, Grabow S, Fairlie WD, Haynes NM, Tarlinton DM, Zhang JG, Belz GT, Smyth MJ, Bouillet P, Robb L, Strasser A (2009) Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature* **461**: 659-U106
- Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS (2001) Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 14250-14255
- Reubold TF, Wohlgemuth S, Eschenburg S (2009) A New Model for the Transition of APAF-1 from Inactive Monomer to Caspase-activating Apoptosome. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 32717-32724
- Reubold TF, Wohlgemuth S, Eschenburg S (2011) Crystal Structure of Full-Length Apaf-1: How the Death Signal Is Relayed in the Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Structure* **19**: 1074-1083
- Riedl SJ, Li WY, Chao Y, Schwarzenbacher R, Shi YG (2005) Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. *Nature* **434**: 926-933
- Rodriguez J, Lazebnik Y (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & Development* **13**: 3179-3184
- Salvesen GS, Dixit VM (1999) Caspase activation: The induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 10964-10967
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo Journal* **17**: 1675-1687
- Schleich K, Warnken U, Fricker N, Ozturk S, Richter P, Kammerer K, Schnolzer M, Krammer PH, Lavrik IN (2012) Stoichiometry of the CD95 Death-Inducing Signaling Complex: Experimental and Modeling Evidence for a Death Effector Domain Chain Model. *Molecular Cell* **47**: 306-319
- Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, Heinrich M, Merkel O, Ehrenschwander M, Adam D, Mentlein R, Kabelitz D, Schutze S (2004) Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: Internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity* **21**: 415-428

- Shiozaki EN, Chai JJ, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li PW, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi YG (2003) Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Molecular Cell* **11**: 519-527
- 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 Journal* **21**: 4520-4530
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Molecular Cell* **1**: 949-957
- Srinivasula SM, Ahmad M, Guo Y, Zhan Y, Lazebnik Y, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (1999) Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that can regulate apoptosis. *Cancer Research* **59**: 999-1002
- Srinivasula SM, Ashwell JD (2008) IAPs: What's in a name? *Molecular Cell* **30**: 123-135
- Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM, Salvesen GS (1999) Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 8359-8362
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, Elliston KO, Ayala JM, Casano FJ, Chin J, Ding GJF, Egger LA, Gaffney EP, Limjuco G, Palyha OC, Raju SM, Rolando AM, Salley JP, Yamin TT, Lee TD, Shively JE, Maccross M, Mumford RA, Schmidt JA, Tocci MJ (1992) A NOVEL HETERODIMERIC CYSTEINE PROTEASE IS REQUIRED FOR INTERLEUKIN-1-BETA PROCESSING IN MONOCYTES. *Nature* **356**: 768-774
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: Enemies within. *Science* **281**: 1312-1316
- Torok NJ, Higuchi H, Bronk S, Gores GJ (2002) Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release by nitrosylating caspase 9. *Cancer Research* **62**: 1648-1653
- Uren AG, O'Rourke K, Aravind L, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular Cell* **6**: 961-967
- Wachmann K, Pop C, van Raam BJ, Drag M, Mace PD, Snipas SJ, Zmasek C, Schwarzenbacher R, Salvesen GS, Riedl SJ (2010) Activation and Specificity of Human Caspase-10. *Biochemistry* **49**: 8307-8315
- Wang L, Du FH, Wang XD (2008) TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* **133**: 693-703
- Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H, Yuan JY (1994) ICH-1, AN ICE/CED-3-RELATED GENE, ENCODES BOTH POSITIVE AND NEGATIVE REGULATORS OF PROGRAMMED CELL-DEATH. *Cell* **78**: 739-750
- Wang LW, Yang JK, Kabaleeswaran V, Rice AJ, Cruz AC, Park AY, Yin QA, Damko E, Jang SB, Raunser S, Robinson CV, Siegel RM, Walz T, Wu H (2010) The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**: 1324-U1176
- Weber CH, Vincenz C (2001) A docking model of key components of the DISC complex: death domain superfamily interactions redefined. *Febs Letters* **492**: 171-176
- Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes & Development* **14**: 2060-2071
- Wilkinson JC, Wilkinson AS, Galban S, Csomos RA, Duckett CS (2008) Apoptosis-inducing factor is a target for ubiquitination through interaction with XIAP. *Molecular and Cellular Biology* **28**: 237-247

- Wilson R, Goyal L, Ditzel M, Zachariou A, Baker DA, Agapite J, Steller H, Meier P (2002) The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis. *Nature Cell Biology* **4**: 445-450
- Wurstle ML, Laussmann MA, Rehm M (2012) The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Experimental Cell Research* **318**: 1213-1220
- Yan N, Chai JJ, Lee ES, Gu LC, Liu Q, He JQ, Wu JW, Kokel D, Li HL, Hao Q, Xue D, Shi YG (2005) Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **437**: 831-837
- Yoo SJ, Huh JR, Muro I, Yu H, Wang LJ, Wang SL, Feldman RMR, Clem RJ, Muller HAJ, Hay BA (2002) Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nature Cell Biology* **4**: 416-424
- Yu XC, Wang L, Acehan D, Wang XD, Akey CW (2006) Three-dimensional structure of a double apoptosome formed by the *Drosophila* Apaf-1 related killer. *Journal of Molecular Biology* **355**: 577-589
- Yuan JY, 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
- Yuan SJ, Akey CW (2013) Apoptosome Structure, Assembly, and Procaspase Activation. *Structure* **21**: 501-515
- Yuan SJ, Yu XC, Asara JM, Heuser JE, Ludtke SJ, Akey CW (2011a) The Holo-Apoptosome: Activation of Procaspase-9 and Interactions with Caspase-3. *Structure* **19**: 1084-1096
- Yuan SJ, Yu XC, Topf M, Dorstyn L, Kumar S, Ludtke SJ, Akey CW (2011b) Structure of the *Drosophila* Apoptosome at 6.9 angstrom Resolution. *Structure* **19**: 128-140
- Yuan SJ, Yu XC, Topf M, Ludtke SJ, Wang XD, Akey CW (2010) Structure of an Apoptosome-Procaspase-9 CARD Complex. *Structure* **18**: 571-583
- Zhang HH, Gogada R, Yadav N, Lella RK, Badeaux M, Ayres M, Gandhi V, Tang DG, Chandra D (2011) Defective Molecular Timer in the Absence of Nucleotides Leads to Inefficient Caspase Activation. *Plos One* **6**: 11

* značí sekundární citace