

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY

Katedra buněčné biologie

Oddělení fyziologie a biochemie buňky

Bakalářská práce

Role kaspáz v migraci savčích buněk

Lenka Kasalová

Školitel: RNDr. Daniel Rösel, PhD.

2008

Poděkování patří mému školiteli **RNDr. Danielovi Röselovi, PhD.** za jeho trpělivost a věcné rady, které bezpochyby vedly ke zkvalitnění mé práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Janu Brábkovi, PhD., všem členům laboratoře a kamarádu Pavlu Pitulemu.

Prohlašuji, že bakalářskou práci na téma: Role kaspáz v migraci savčích buněk jsem vypracovala sama z uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha 2008

Abstrakt

Kaspázy jsou proteázy známé především svojí funkcí v apoptóze, programované buněčné smrti. V poslední době se ukazuje, že kaspázy se účastní i dalších pro buňku nezbytných procesů, mezi které patří i migrace buněk. Buněčná migrace představuje komplex koordinovaných procesů, který nachází uplatnění v embryonálním vývoji, imunitních odpovědích, při hojení ran, angiogenezi a tvorbě metastáz. V imunitním systému je pro migraci buněk důležitá kaspáza-1 a kaspáza-11. Kaspáza-1 aktivuje interleukin-1 β (IL-1 β) a tím aktivuje migraci Langerhansových buněk. Kaspáza-11 reguluje migraci T-lymfocytů do místa infekce. V migraci rakovinných buněk je důležitá kaspáza-3, která může aktivovat migraci buněk přes aktivaci fosfolipázy A₂ (iPLA₂), nebo aktivaci ROCK-I kinázy, nebo naopak inhibovat migraci štěpením D4-GDI. Další důležitou kaspázou v migraci buněk je kaspáza-8, která aktivuje kalpain, a tím aktivuje migraci buněk závislých na kalpainu. Problematika vlivu kaspáz na regulaci buněčné migrace není zatím objasněna. Stále se zvyšující množství experimentálních výsledků o neapoptotické roli kaspáz umožňuje předpokládat, že v budoucnosti budou objeveny další regulační funkce kaspáz, a to jak v buněčné migraci, tak i v dalších pro buňku významných neapoptotických procesech.

Klíčová slova

buněčná migrace, kaspáza-1, kaspáza-3, kaspáza-8, kaspáza-11, iPLA₂, ROCK, D4-GDI, kalpain

Abstract

Caspases are proteases well known for their role in apoptosis, programmed cell death. Recently, new evidences, indicating that caspases are implicated in a broad range of functions including cell migration, were found. Cell migration is a complex of coordinated processes important in embryogenesis, immune response, during wound healing, in angiogenesis and cancer. Caspase-1 and caspase-11 are important in migration of immune cells. Caspase-1 activates interleukin-1 β , which is required for activation of Langerhans cells migration. Caspase-11 regulates migration of lymphocytes to the site of infection. Caspase-3 is important for migration of cancer cells. Caspase-3 activates migration through activation of phospholipase A₂ or through activation of ROCK-1 kinase. In addition, caspase-3 inhibits migration through cleavage of D4-GDI. Another caspase important in cell migration is caspase-8, which activates migration dependent on calpain activity. The role of caspases in cell migration is not fully understood. Ever-increasing amount of experimental data in nonapoptotic role of caspases suggests that novel regulatory mechanisms of caspases function both in cell migration and other nonapoptotic processes will be found.

Obsah

ABSTRAKT	3
KLÍČOVÁ SLOVA	3
ABSTRACT	4
SEZNAM ZKRATEK	6
ÚVOD	7
1. KASPÁZY.....	8
1.1. Historie objevení kaspáz.....	8
1.2. Struktura a enzymatická aktivita kaspáz	9
1.2.1. Struktura prokaspáz.....	9
1.2.2. Struktura aktivních kaspáz	10
1.2.3. Architektura aktivního místa.....	12
2. MIGRACE BUNĚK.....	15
2.1. Role kaspáz v migraci buněk imunitního systému.....	15
2.1.1. Role kaspázy-1 v migraci myších Langerhansových buněk	15
2.1.2. Kaspáza-11 reguluje migraci buněk do místa infekce	16
2.2. Vliv kaspáz na migraci rakovinných buněk	18
2.2.1. Vliv kaspázy-3 na migraci ovariálních nádorových buněk pomocí iPLA ₂	18
2.2.2. Kaspáza-3 a její role v invazivitě krysích hepatomů	19
2.2.3. Kaspáza-3 štěpí a tím aktivuje ROCK kinázu, která hraje klíčovou roli v invazivitě rakovinných buněk	20
2.2.4. LIMK-1 kináza je substrátem kaspázy-3	22
2.2.5. D4-GDI je substrátem kaspáz, a jeho hladina je zvýšena v některých nádorech.....	23
2.2.6. Kaspáza-8 podporuje buněčnou migraci pravděpodobně přes aktivaci kalpainu	24
ZÁVĚR	26
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	27

Seznam zkratek

Ac-YVAD-cmk - inhibitor kaspázy-1
Aip1 - aktin interakční protein 1
Akt - synonymní název protein kinázy B
APC - antigen prezentující buňky
C3 - inhibitor Rho GTPáz
CARD - domén kaspáz, (caspase recruitment domain)
Cdc42 - člen rodiny malých Rho GTPáz
crmA - virový inhibitor kaspázy-8
D4-GDI (= Ly-GDI) - GDP disociační inhibitor Rho rodiny GTPáz
DED - doména kaspáz, (death effector domain)
DFF - DNA fragmentační faktor
DEVD - inhibitor kaspázy-3
F-aktin - vláknitý aktin
ICE - synonymní název kaspázy-1, (interleukin-1 β -converting enzyme)
IL-1 β - interleukin-1 β
iPLA₂ - na vápníku nezávislá fosfolipáza A₂
LC - Langerhansovy buňky
LIMK - kináza s LIM doménami
LPA - lysofosfatidová kyselina
MLC - lehký řetězec myosinu
MLCK - kináza lehkého řetězce myosinu
PAK - p21 aktivovaná kináza
PARP - polymeráza, (poly-(ADP-ribose) polymerase)
Rac - člen rodiny malých Rho GTPáz
Rho - člen rodiny malých Rho GTPáz
RNAi - RNA interference
ROCK - Rho aktivovaná kináza
siRNA - malá interferující RNA
TNF- α - faktor nekrotizující nádory
zVAD - obecný inhibitor kaspáz
Z-Asp - obecný inhibitor kaspáz

Úvod

Kaspázy jsou cysteinové proteázy známé především svojí rolí v apoptóze. Apoptóza, programovaná buněčná smrt, je charakteristická změnami jak morfologickými, tak změnami fyziologickými. Mezi tyto změny patří zmenšování buněčného objemu, membránový blebbing, fragmentace DNA, rozrušení cytoskeletu, zrušení adhezivních spojů, tvorba apoptotických tělísek a jejich následné pohlcování okolními buňkami. Apoptóza hraje důležitou roli ve vývoji organismu a v destrukci poškozených nebo napadených buněk. Avšak kaspázy nejsou pouze nástroji apoptózy, ale účastní se i mnoha dalších procesů, jako je například diferenciace, proliferace a regulace buněčného cyklu, internalizace receptorů, aktivace různých genů a podstatnou roli hraje i v imunitních mechanismech. V neposlední řadě se kaspázy účastní regulace buněčné migrace, což je velmi důležitý biologický proces, který nachází uplatnění v embryonálním vývoji, imunologických a zánětlivých odpovědích, při hojení ran a angiogenezi, a mimo jiné také v nefyziologických procesech, jako je např. tvorba metastáz v nádorech. Cíl této práce je shrnout dosavadní poznatky o vlivu kaspáz na migraci savčích buněk.

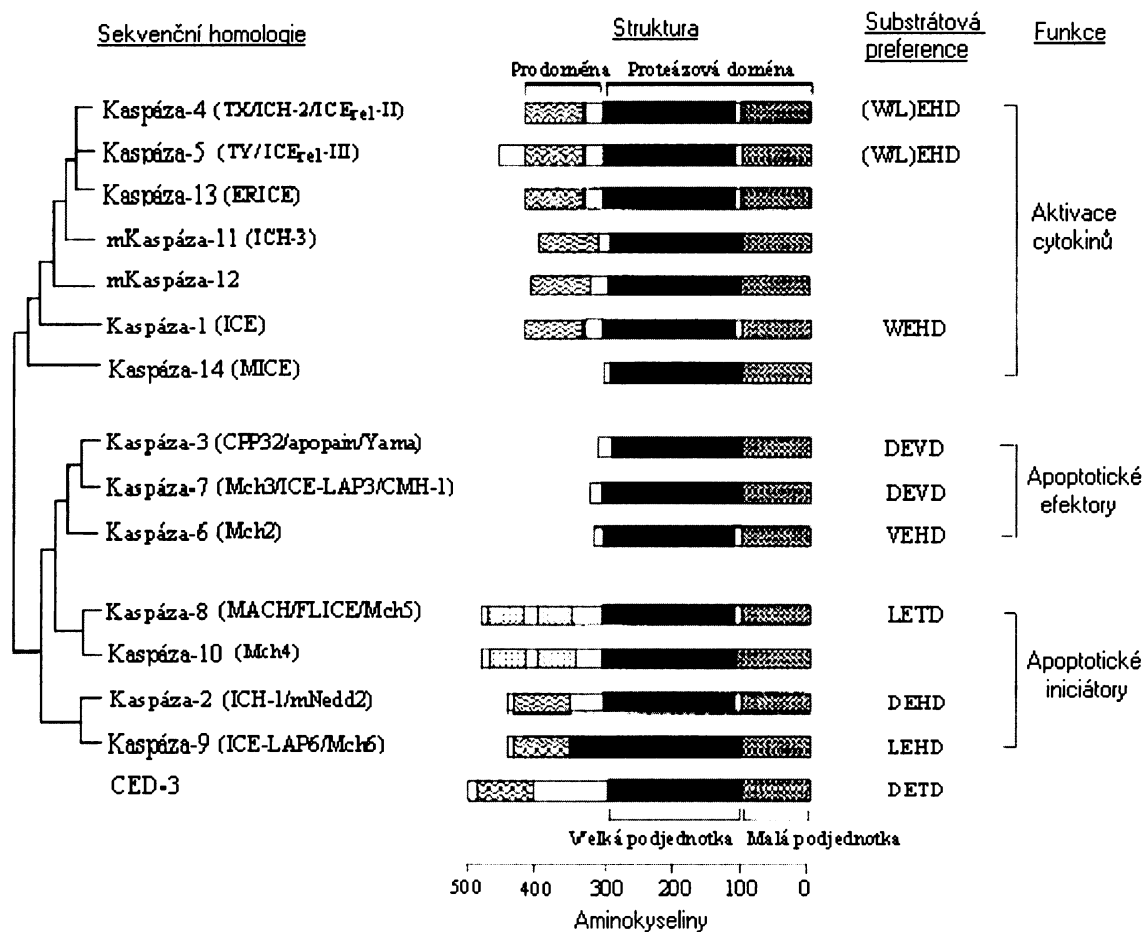
1. Kaspázy

1.1. Historie objevení kaspáz

V roce 1992 byla objevena proteáza, která byla zodpovědná za štěpení a aktivaci prekurzoru interleukinu -1 β (IL-1 β), a tato zánětlivá proteáza byla pojmenována ICE (interleukin-1 β -converting enzyme). O několik měsíců později bylo zjištěno, že ICE je homologem produktu genu CED3, který hraje podstatnou roli v apoptóze *Caenorhabditis elegans* (Yuan *et al.*, 1993). Tento objev zahájil úspěšnou éru hledání nových savčích homologů ICE, a zkoumání jejich funkcí v savčí programované buněčné smrti (shrnutí v Fuentes-Prior a Salvesen, 2004). V savčích buňkách bylo prozatím identifikováno 15 odlišných homologů těchto enzymů (převzato z Nhan *et al.*, 2006).

Dnes jsou tyto enzymy v savčích buňkách nazývány kaspázami. Název kaspázy (anglicky caspases) je odvozen od skutečnosti, že tyto enzymy mají v aktivním jádře cystein, a selektivně štěpí proteiny v místě aspartátového zbytku (cysteine-dependent aspartate-specific proteinases). Kaspázy patří do rodiny cysteinových proteáz a jako ostatní proteázy téhož typu vyžadují pro svojí aktivitu kationt Zn^{2+} , který interaguje s katalytickým thiolem cysteinu (převzato z Chang a Yang, 1999).

Kaspázy jsou v podvědomí odborné veřejnosti spojovány především s apoptózou, ale v poslední době se ukazuje, že kaspázy mají vliv i v dalších fyziologických funkcích buňky. Podle strukturní podobnosti lze kaspázy rozdělit do tří skupin. Do první skupiny označované jako podrodina kaspázy-1 jsou řazeny kaspázy-1, -4, -5, -11, -12, -13, -14, a účastní se zánětlivých procesů. Druhá skupina kaspáz je označována jako podrodina kaspázy-3 a patří do ní kaspáza-3, -6, -7, -8, -10. Do třetí skupiny je zahrnuta kaspáza-2, -9 (viz obr.1) (shrnutí v Ernshaw *et al.*, 1999; Chang a Yang, 2000). Podle funkce se kaspázy dále dělí na apoptotické a neapoptotické kaspázy, hranice těchto dvou tříd kaspáz jsou však velice rozostřené, neboť kaspázy důležité pro apoptózu zároveň plní v buňce další funkce. Podle hierarchie aktivace během apoptózy lze apoptotické kaspázy dále rozdělit na iniciátorové a efektorové kaspázy. Iniciátorové kaspázy jsou takové kaspázy, které jsou aktivovány oligomerizací (kaspáza-8, -10, -2, -9), efektorové kaspázy vyžadují ke své aktivaci iniciátorovou kaspázu, nebo jinou proteázu (kaspáza-3, -6, -7) (shrnutí v Chang a Yang, 2000).



Obr.1 Fylogenetický strom savčích kaspáz a CED-3 založené na sekvenční homologii proteázových domén. V závorkách jsou uvedeny alternativní názvy kaspáz (převzato a upraveno z Chang a Yang, 2000).

1.2. Struktura a enzymatická aktivita kaspáz

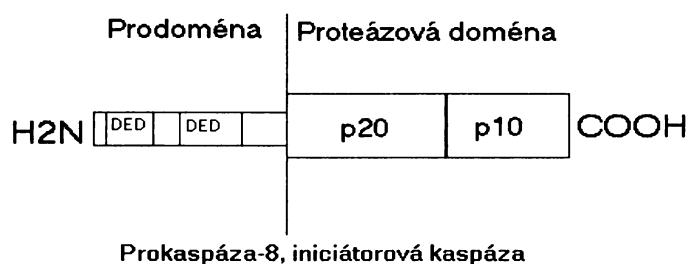
1.2.1. Struktura prokaspáz

Kaspázy jsou syntetizovány jako zymogeny (převzato z Ernshaw *et al.*, 1999). Primární struktura prokaspáz se skládá z N-koncové **prodomény** a C-koncové **proteázové domény** (viz obr.2). U některých kaspáz prodoména chybí a N-konec je tvořen pouze koncovým peptidem variabilní délky (převzato z Chang a Yang, 2000).

Proteázová doména je velice homologní ve všech kaspázách. Její součástí jsou dvě podjednotky. Velká podjednotka, která má velikost přibližně 20 kDa (17-20 kDa) a je nazývána p20, a malá podjednotka, jejíž velikost je přibližně 10 kDa (10-12 kDa) a je označována p10 (shrnutí v Chang a Yang, 2000; Fuentes-Prior a Salvesen, 2004). V některých prokaspázách je mezi velkou a malou doménou přítomen ještě malý linker (okolo

10 aminokyselin), který je při maturaci proteinu odstraněn (shrnutí v Ernshaw *et al.*, 1999; Chang a Yang, 2000).

Velikost prodomény je značně variabilní, velikost je od 23 aminokyselin u kaspázy-6, -7, až do 219 aminokyselin u kaspázy-10 (shrnutí v Ernshaw *et al.*, 2000). Delší prodoména (od 100 aminokyselin) se vyskytuje u iniciátorových apoptotických kaspáz a u kaspáz účastnících se produkce cytokinů, zatímco kratší prodoménu mají efektorové kaspázy. Ačkoliv delší prodoména je mezi kaspázami na rozdíl od katalytické části značně divergentní, můžeme v této prodoméně naléznout podobné strukturní motivy, DED (death effector domain) a CARD (caspase recruitment domain). DED doména je součástí prokaspázy-8 a -10, a je zde přítomna v tandemově uspořádané dvojici. CARD doména se vyskytuje v kaspázách-1, -2, -4, -5, -9. Tyto domény zprostředkovávají interakce prokaspáz mezi sebou, interakce s adaptorovými signálními proteiny, a hrají důležitou roli v aktivaci kaspáz. Kratší forma prodomény efektorových kaspáz žádný motiv neobsahuje, ale pravděpodobně také zprostředkovává protein-proteinové interakce (shrnutí v Ernshaw *et al.*, 1999; Chang a Yang, 2000).

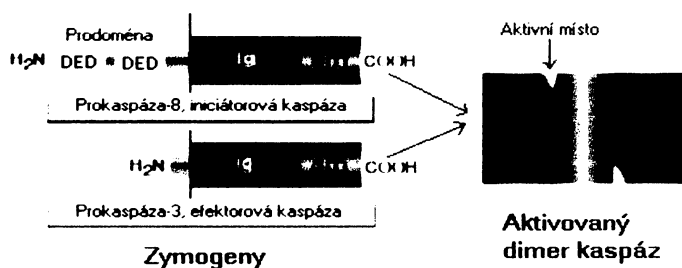


Obr.2 Struktura prokaspázy-8 složená z N-koncové prodomény, a C-koncové proteázové domény. Prodoména je tvořena tandemově uspořádanými doménami DED, jiné kaspázy mají místo domény DED, doménu CARD, jiné pouze krátký peptid. Svislá čára označuje odštěpení prodomény při maturaci prokaspázy.

1.2.2. Struktura aktivních kaspáz

Aktivní kaspáza vzniká samouspořádáním dvou prokaspáz, od kterých se před tím proteolyticky odštěpí prodoména. Proteázová doména se proteolyticky rozdělí na p10 a p20 podjednotku (shrnutí v Ernshaw *et al.*, 1999). V některých případech iniciátorové kaspázy nemusí projít proteolytickým štěpením a také dosáhnou aktivního stavu, např. kaspáza-9 (převzato z Fuentes-Prior a Salvesen, 2004; Nhan *et al.*, 2006). Výsledný aktivní enzym je tedy tetramer, který je označován jako homodimer heterodimerů (homodimery jsou vzájemně

uspořádány v rotační symetrii). Tetramer je složen ze dvou malých podjednotek, které jsou obklopeny dvěma velkými podjednotkami (viz obr.3).

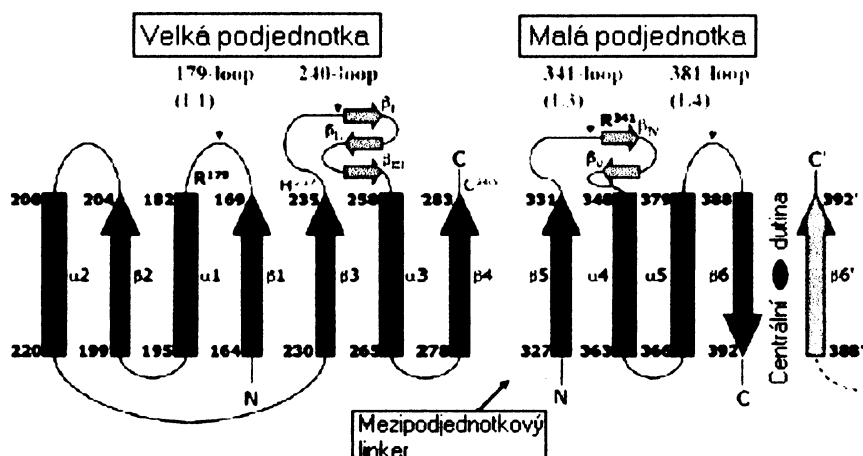


Obr.3 Schéma aktivace kaspáz (převzato a upraveno z Ernshaw *et al.*, 1999).

Velká a malá podjednotka v každém heterodimeru se zúčastňuje formování globulární domény, která je tvořena šesti převážně paralelně uspořádanými β -řetězci složenými do β -listu, který obklopují α -helixy. Dva heterodimery vzájemně asociují díky interakcím dvou p10 podjednotek. Spojení se uskutečňuje pomocí antiparalelního propojení $\beta 6$ C-konce s $\beta 6'$ C-koncem (viz obr.4, 5) (shrnuto v Ernshaw *et al.*, 1999; Chang a Yang, 2000; Fuentes-Prior a Salvesen, 2004).



Obr.4 Krystalová struktura aktivní kaspázy-8, je znázorněna vazba inhibitoru do aktivního místa, 12 β -řetězců obklopených α -helixy, interakce dvou globulárních domén pomocí $\beta 6$ a $\beta 6'$ řetězce malých podjednotek a doplňkové interakce pomocí N- a C- konců p10 a p20 podjednotek (převzato z Fuentes-Prior a Salvesen, 2004).



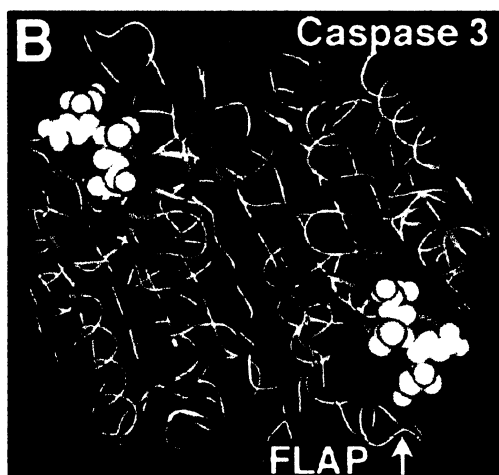
Obr.5 Topologické schéma aktivní kaspázy-8.

Mezipodjednotkovým linkerem je znázorněno místo odštěpení velké a malé podjednotky, dále je zde označeno místo spojení dvou heterodimérů pomocí interakcí $\beta 6$ a $\beta 6'$ řetězců, dále jsou zde naznačeny polohy důležitých aminokyselin, histidinu v poloze 237 (His-237) a cysteinu v pozici 285 (Cys-285)

(převzato a upraveno z Fuentes-Prior a Salvesen, 2004).

1.2.3 Architektura aktivního místa

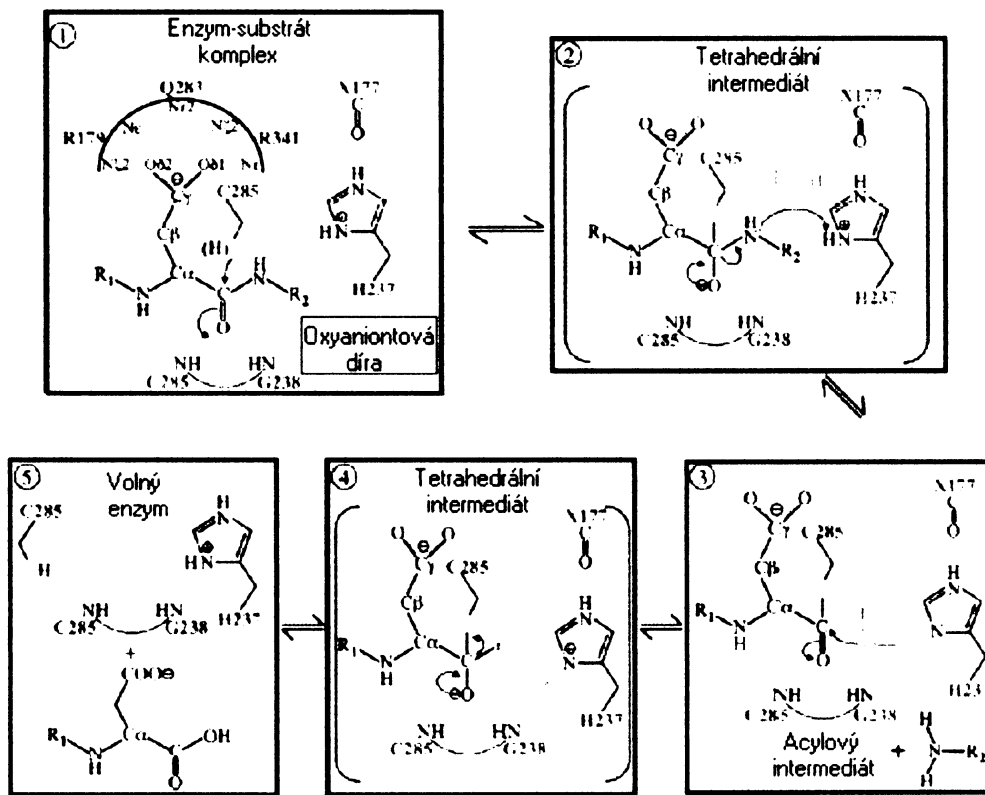
Tetramer obsahuje dvě aktivní místa na opačných koncích molekuly. Aktivní místo je formováno jak aminokyselinami velké podjednotky, tak aminokyselinami malé podjednotky (viz obr.6). V aktivním místě jsou přítomny aminokyseliny, které jsou vysoce konzervativní, a jejich mutace vedou k částečné nebo úplné ztrátě enzymatických vlastností kaspáz (převzato z Ernshaw *et al.*, 1999).



Obr.6 3D struktura aktivní kaspázy-3.

Flap (=klapka, chlopeč) částečně vymezuje aktivní místo, modře jsou označeny velké podjednotky, žlutě malé podjednotky, substrát je označen bíle, zeleně jsou označeny nenabitě polární aminokyseliny, oranžově hydrofóbní, modře bazické, červeně kyselé aminokyseliny (převzato z Ernshaw *et al.*, 1999).

Jednou z nejdůležitějších aminokyselin aktivního místa je **cystein** na pozici 285 (Cys-285), který je umístěn na p20 podjednotce v linkeru mezi β 4- β 5 řetězcem. Dalšími důležitými aminokyselinami jsou **histidin** na pozici 237 (His-237), který leží na smyčce p20 podjednotky spojující β 3-řetězec a α 3-helix, a **glycin** v pozici 238 (Gly-238) umístěný na stejné smyčce jako His-237 (viz obr.5). Cystein je v blízkosti imidazolu histidinu, který cysteinu odebrá proton a zvyšuje tím jeho nukleofilní vlastnosti. Cystein nukleofilně atakuje karbonylový uhlík P1 aspartátu (P1 je označován Asp substrátu kaspáz, za kterým kaspázy tento substrát štěpí), vzniká tetrahedrální meziprodukt, který je stabilizován vodíkovými můstky na amino-skupiny Gly-238 a Cys-285 (viz obr.7) (shrnuo v Ernshaw *et al.*, 1999; Chang a Yang, 2000; Fuentes-Prior a Salvesen, 2004).



Obr.7 Schéma štěpení substrátu (převzato a upraveno z Fuentes-Prior a Salvesen, 2004).

1. *Acylační krok; karbonylový kyslík P1 je navázán vodíkovými vazbami na NH-skupinu Gly-238 a Cys-285, toto uskupení zvyšuje polaritu C-O vazby a tím ulehčuje nukleofilní atak SH skupiny Cys-285 na vysoce elektrofilní karbonylový uhlík.*
2. *Tetrahedrání intermediát- kovalentní propojení enzym-substrát; imidazol His-237 katalyzuje protonaci aminoskupiny sbrstrátu, a tím zapříčiní rozštěpení peptidu.*
3. *Deacylace acyl-enzymového komplexu; deprotonovaný His-237 přitahuje proton molekuly vody.*
4. *Deacylace je spojena s tvorbou sekundárního tetrahedráního intermediátu; hydrolyza vody aktivuje atak na thioesterovou vazbu, následuje nukleofilní atak hydroxy skupiny na karbonylový uhlík a zrušení S-C vazby mezi enzymem a produktem.*
5. *Regenerace enzymu a uvolnění zbytku rozštěpeného substrátu.*

Aktivní místo je kromě výše zmíněných třech aminokyselin tvořeno čtyřmi kapsami S1-S4. V S1 kapse je umístěn arginin v pozici 179 (p20), arginin v pozici 341 (p10) a glutamin v pozici 283, tyto basicke aminokyseliny se podílejí na přímých iontových interakcích s kyselinou asparagovou (Asp), a přispívají tím k selektivnímu rozpoznání Asp v P1 pozici substrátu (shrnuto v Ernshaw *et al.*, 1999; Chang a Yang, 2000; Fuentes-Prior a Salvesen, 2004). S2 a S3 kapsu tvoří aminokyseliny malé podjednotky (převzato z Ernshaw *et al.*, 1999). Hlavní odlišnosti mezi kaspázami jsou v S4 kapse, např. kaspáza-1 má velkou mělkou hydrofobní jamku, kaspáza-3 má úzkou hydrofilní jamku. S4 kapsa je tvořena aminokyselinami malé podjednotky a spolu s aminokyselinou substrátu v pozici P4 určují substrátovou specifitu kaspáz (shrnuto v Ernshaw *et al.*, 1999; Chang a Yang, 2000). Aminokyseliny substrátu v pozici P2 a P3 mají jen omezený vliv na substrátovou specifitu kaspáz, neboť jejich řetězce jsou odvráceny od těla enzymu a jsou exponovány do rozpouštědla (viz obr. 8) (převzato z Chang a Yang, 2000).



Obr. 8 Elektrostatický povrch kaspázy s navázaným substrátem.

P1-P4 jsou aminokyseliny substrátu, modrá barva označuje velkou podjednotku, červená barva malou podjednotku (převzato z Fuentes-Prior a Salvesen, 2004).

Další strukturní znak přispívající k rozdílné substrátové specifitě kaspáz je přítomnost, či nepřítomnost smyčky připomínající chlopeň nad aktivním místem. Ta je přítomna v subrodině kaspázy-3 a může vysvětlit selhání některých kaspáz při štěpení konsenzuálních štěpných míst. Toto selhání je pravděpodobně způsobeno sterickými překážkami. Tato chlopeň je místem post-translačních úprav, např. fosforylace, a může mít potenciální regulační vlastnost (převzato z Ernshaw *et al.*, 1999).

2. Migrace buněk

Migrace buněk má významnou roli v mnoha fyziologických i patologických procesech. Migrace je nezbytná pro embryonální vývoj a homeostázi imunitního systému. Uplatňuje se při hojení ran, angiogenezi, zánětlivých odpovědích, a mimo jiné je migrace důležitá pro tvorbu metastáz. Buněčná migrace představuje komplex koordinovaných procesů, který je modulován různými chemokiny a růstovými faktory.

Na možnost, že kaspázy regulují buněčnou migraci poprvé ukázaly výsledky skupiny Watanabe a Akaike (Watanabe a Akaike, 1999). Autoři ukázali, že při inkubaci různých typů buněk (NIH 3T3, Swiss 3T3, hepatocyty) s nespecifickými obecnými inhibitory kaspáz Z-Asp-CH₂-DCB (Z-Asp) byla inhibována motilita buněk na kolagenem pokrytém povrchu. Inhibice pohyblivosti buněk byla spojena se snížením hladiny rodiny kaspázy-3. Avšak při použití specifických inhibitorů kaspázy-3 a kaspázy-1 se tento efekt neprojevil, a tak specifická kaspáza a mechanismus, kterým reguluje migraci zůstal prozatím neznámý.

2.1. Role kaspáz v migraci buněk imunitního systému

2.1.1. Role kaspázy-1 v migraci myších Langerhansových buněk

Langerhansovy buňky (LC) jsou profesionální antigen prezentující buňky (APC), které mají nezastupitelnou funkci při prvním kroku kožní imunitní odpovědi. Při kontaktu s antigenem migrují z epidermis aferentními lymfatickými cévami do lymfatických uzlin, kde prezentují jimi zpracovaný antigen T lymfocytům. Tato migrace LC buněk je řízena dvěma důležitými cytokiny TNF- α a IL-1 β , které účinkují na LC buňky společně (Cumberbatch *et al.*, 1997).

Po antigenní stimulaci LC buňky migrují z epidermis do lymfatických uzlin. Myší LC buňky s deletovaným genem pro kaspázu-1 tuto migraci po antigenní stimulaci nevykazují (Antonopoulos *et al.*, 2001). Takto poškozené LC buňky nemigrují ani po intradermální injekci TNF- α cytokinu, který migraci nepoškozených buněk podporuje. Avšak intradermální zavedení IL-1 β migraci LC buněk stimuluje jak v případě nepoškozených LC buněk, tak buněk s poškozeným genem pro kaspázu-1 (Antonopoulos *et al.*, 2001). Tato skutečnost je podmíněna tím, že IL-1 β a TNF- α působí na LC buňky společně. Nepřítomnost TNF- α může být nahrazena sousedními keratinocyty (Kock *et al.*, 1990), zatímco IL-1 β je primárně

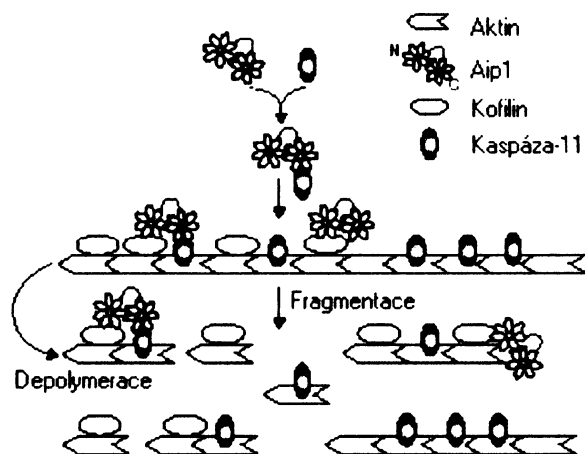
syntetizován pouze LC buňkami (Enk a Katz, 1992). V případě, že jsou LC buňky deficientní na kaspázu-1, IL-1 β nemůže být štěpen na svojí zkrácenou aktivní formu, a nemůže být sekretován (Antonopoulos *et al.*, 2001).

Na význam kaspázy-1 v migraci LC buněk ukazuje i účinek inhibitoru kaspázy-1 (Ac-YVAD-cmk), který účinně blokuje LC migraci jak *in vitro*, tak *in vivo* (Antonopoulos *et al.*, 2001). Kaspáza-1 je navíc důležitá i v určování správného množství LC buněk v epidermis, neboť počet LC buněk s poškozenou kaspázou-1 je v epidermis značně snížen (Antonopoulos *et al.*, 2001).

2.1.2. Kaspáza-11 reguluje migraci buněk do místa infekce

Kaspáza-11 je důležitým enzymem v zánětlivé odpovědi organismu, kde důležitou roli hrají tři děje, buněčná migrace, cytokinová maturace a apoptóza. Kaspáza-11 aktivuje v počáteční fázi hostitelské obrany maturaci cytokinů v lymfocytech namigrovaných do místa infekce (Wang *et al.*, 1996). Její schopnost spouštět apoptózu je využita v pozdější fázi (Kang *et al.*, 2000), kdy svými autodestrukčními mechanismy zabrání dalšímu uvolňování cytokinů. Nedávné studie ukázaly, že kaspáza-11 se podílí i na regulaci migrace T-lymfocytů do místa infekce (Li *et al.*, 2007).

Myší lymfocyty s deletovanou kaspázou-11 vykazují defektní migraci jak v *in vitro* tak v *in vivo* pokusech (Li *et al.*, 2007). Autoři ukázali, že kaspáza-11 interaguje jak fyzicky, tak i funkčně s Aip1 proteinem (actin interacting protein 1), což je důležitý aktivátor kofilinem zprostředkované fragmentace vláknitého aktinu (F-aktin) (Ono, 2003). Kaspáza-11 tedy zprostředkovaně aktivuje fragmentaci F-aktinu, a mimo jiné má sama vlastní afinitu k F-aktinu (Li *et al.*, 2007). N-koncová část Aip1 je důležitá pro aktivaci kofilinem zprostředkovanou fragmentaci aktinového vlákna (Mohri *et al.*, 2004), zatímco C-koncová část Aip1 přes WD40 doménu interaguje s CARD doménou kaspázy-11 (Li *et al.*, 2007). Interakce mezi CARD a WD40 může usnadňovat proteinu Aip1 nasedat na kofilin, který se kooperativně váže především na tu část vláknitého aktinu, kde je už GTP hydrolyzováno na GDP. Interakce Aip1 s kofilinem a kaspázou-11 ulehčuje kofilinem zprostředkovanou fragmentaci aktinových vláken (viz obr.9) (Li *et al.*, 2007). Takto fragmentovaná vlákna aktinu poskytnou buňce mnoho nových míst, kde může nastat intenzivní polymerace, což vede k polarizaci buňky a následně k orientované migraci.



Obr. 9 Model aktinové fragmentace zprostředkované kaspázou-11 (převzato a upraveno z Li *et al.*, 2007).

Bylo zjištěno, že když má buňka deletovaný gen pro kaspázu-11, nebo deletovaný gen pro Aip1, tak je porušena aktinová dynamika buňky (Li *et al.*, 2007). Pomocí *in vitro* aktinové depolymerizační assaye bylo zjištěno, že Aip1 a kaspáza-11 při kofilinem zprostředkované fragmentaci F-aktinu pracují kooperativně (Li *et al.*, 2007).

Pro regulační mechanismus migrace závislým na kaspáze-11 je zajímavý kompenzační efekt, když je exprese nějaké komponenty inhibována. Snížená exprese Aip1 proteinu pomocí RNAi je kompenzována zvýšenou aktivací kaspázy-11 a kofilinu, zatímco hladina p-koofilinu¹ je snížena (Li *et al.*, 2007). Tato kompenzace je schopna částečně obnovit migraci. Myší buňky s defektní kaspázou-11 zase vykazují zvýšenou expresi kofilinu, zatímco hladina Aip1 proteinu zůstává stále stejná (Li *et al.*, 2007).

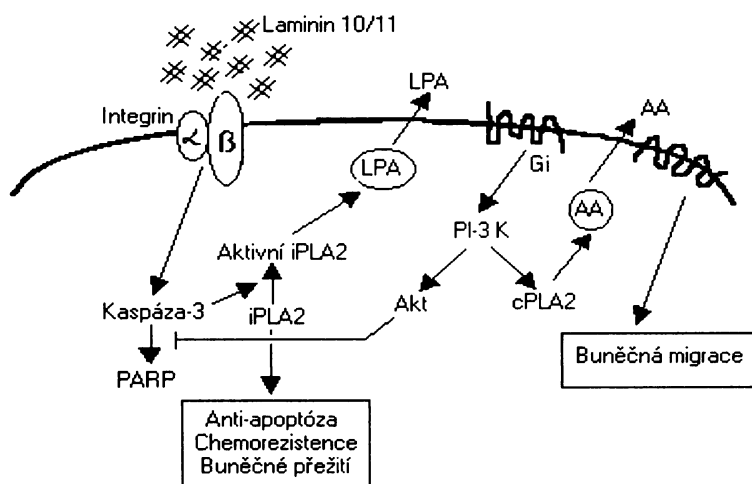
¹ fosforylovaný kofilin je neaktivní forma (Arber *et al.*, 1998)

2.2. Vliv kaspáz na migraci rakovinných buněk

2.2.1. Vliv kaspázy-3 na migraci ovariálních nádorových buněk pomocí iPLA₂

Jednou z důležitých vlastností na vápníku nezávislé fosfolipázy A₂ (iPLA₂) je kontrola fosfolipidové homeostáze, kterou zajišťuje pomocí remodelace membránových struktur (shrnutí v Balsinde *et al.*, 1999). iPLA₂ je proteolyticky aktivována kaspázou-3 v apoptotických buňkách (Atsumi *et al.*, 2000; Lauber *et al.*, 2003). Nedávno byla odhalena skutečnost, že aktivace iPLA₂ pomocí kaspázy-3 je důležitá i při migraci nádorových lidských ovariálních buněk (HEY), kdy buňky apoptózou neprocházejí (Zhao *et al.*, 2006).

Protein extracelulární matrix laminin-10/11 indukuje aktivaci iPLA₂ (Sengupta *et al.*, 2003). Kaspáza-3 je aktivována lamininem-10/11 přes membránový integrin $\beta 1$, a následně je štěpena a aktivována fosfolipáza A₂ (iPLA₂) (Zhao *et al.*, 2006). Tato aktivovaná forma iPLA₂ (514-806 aminokyselin) produkuje lysofosfatidovou kyselinu (LPA) (Sengupta *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2006), což indukuje intracelulární signalizaci, která vede k produkci arachidonové kyseliny (Tang *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2006), a následně na arachidonové kyselině závislé migraci (Tang *et al.*, 1997). LPA také aktivuje kinázu Akt (Zhao *et al.*, 2006), která inhibuje polymerázu PARP (poly-(ADP-ribose) polymerase) a DNA fragmentační faktor DFF (Zhao *et al.*, 2006). PARP (O'Brien *et al.*, 2001) i DFF (Liu *et al.*, 1997) jsou efekторы kaspázy-3 a ukazatele aktivace apoptózy. Tato zpětnovazebná smyčka chrání buňku před apoptózou aktivovanou kaspázou-3 a podporuje migraci (viz obr.10).



Obr.10 Model signální dráhy, kdy kaspáza-3 aktivuje migraci nádorových ovariálních buněk přes aktivaci iPLA₂ (převzato a upraveno z Zhao *et al.*, 2006). (AA=arachidonová kyselina, PI-3K=fosfatidylinositol 3-kináza, cPLA₂=fosfolipáza A₂ závislá na vápníku).

Hlavní produkt aktivace iPLA₂ indukované lamininem-10/11 je štěpená forma iPLA₂ 514-806 aminokyselin, která je odlišná od formy tvořené při apoptóze, iPLA₂ 514-733 aminokyselin (Lauber *et al.*, 2003). Kratší forma je mnohem aktivnější než forma delší (Zhao *et al.*, 2006). Při plně aktivní kaspáze-3 během apoptózy, vznikají právě aktivnější kratší formy (Lauber *et al.*, 2003). Bylo zjištěno, že aktivace kaspázy-3 indukovaná lamininem-10/11 je mírná a pod přísnou kontrolou, a vede k tomu, že iPLA₂ je štěpena pouze v Asp-513. Tato delší forma iPLA₂ nevede k apoptóze, ale k migraci buněk (Zhao *et al.*, 2006).

Vliv kaspázy-3 na aktivaci iPLA₂ a následnou migraci byl dokázán několika způsoby. Bodovou mutací, kdy Asp-513 a Asp-733 byly zaměněny za alanin. V prvním případě mutace zablokovala štěpení iPLA₂ a následnou migraci buněk. V případě mutace v Asp-733 se tento efekt neprojevil (Zhao *et al.*, 2006). Při použití selektivních inhibitorů kaspázy-3, nebo použití siRNA proti kaspáze-3 byla migrace buněk snížena, a bylo zablokováno štěpení endogenní iPLA₂ (Zhao *et al.*, 2006). Tím byla odhalena nová funkce na kaspáze závislé, avšak na apoptóze nezávislé aktivace iPLA₂, která hraje důležitou roli v migraci buněk.

2.2.2. Kaspáza-3 a její role v invazivitě krysích hepatomů

Rakovinné buňky jsou uvnitř celistvého nádoru vystaveny různým stresovým podmínkám, jako je nízké pH, nedostatek kyslíku a živin. Zatímco u normálních buněk by tyto podmínky vyvolaly apoptózu, rakovinné buňky jsou schopny se apoptóze vyhnout, i když jsou kaspázy aktivovány, a navíc tyto stresové podmínky v nich mohou aktivovat nové vlastnosti, jako je například invazivita (shrnuto v Mukai *et al.*, 2005). Na krysích hepatomových buňkách (MM1) bylo dokázáno, že po aplikaci proapoptotických signálů zvyšujících aktivitu kaspázy-3 dojde ke změně morfologie MM1 buněk, a ty se stávají invazivními (Mukai *et al.*, 2005).

MM1 buňky byly vystaveny dvěma proapoptotickým účinkům, hypoxii a etoposidu VP-16, v obou případech invazivita buněk signifikantně stoupla. Pod vlivem těchto proapoptotických stimulů se změnila morfologie buněk z kulovitého tvaru na tvar s pseudopodii a fokálními adhezemi, které byly mimo jiné pozorovány také u MM1 buněk stimulovaných LPA (Mukai *et al.*, 2005). Dále byl za těchto proapoptotických podmínek ukázán vzájemný vztah mezi apoptózou a invazivitou, který byl prokazován na intaktnosti jádra. Porušené buněčné jádro je totiž prvotním znakem apoptotických buněk. I když byla

aktivována kaspáza-3, což je hlavní efektorová kaspáza, většina těchto buněk měla jádra neporušená (Mukai *et al.*, 2005).

Role kaspázy-3 v invazivitě buňky byl prokázán pomocí inhibice kaspázy-3. Při použití peptidového inhibitoru kaspázy-3 DEVD a inhibitoru širokého spektra kaspáz zVAD byla invazivita buněk částečně snížena. Tento pokles invazivity byl dále spojen s morfologickými změnami, kdy se buňky vrátily do svého původního kulovitého tvaru. Podobně po snížení exprese kaspázy-3 pomocí RNA interference (RNAi), došlo také ke snížení invazivity MM1 buněk. Jak inhibitor DEVD, tak RNAi neměly žádný vliv na LPA indukovanou invazivitu MM1 buněk. Tato data naznačují, že pod vlivem stresových podmínek, vyjma LPA indukce, je buněčná invazivita částečně závislá na kaspáze-3. Obdobné závěry plynou i z pokusů s lidskými buňkami rakoviny prsu (MDA-MB-231) (Mukai *et al.*, 2005).

Skutečnost, že inhibice kaspázy-3 v MM1 a MDA-MB-231 buňkách neměla vliv na snížení invazivity indukované LPA, ukazuje na fakt, že kaspáza-3 ovlivňuje migraci buněk různými způsoby, ne jen přes aktivaci iPLA₂.

2.2.3. Kaspáza-3 štěpí a tím aktivuje ROCK kinázu, která hraje klíčovou roli v invazivitě rakovinných buněk

Největším problémem v léčbě rakoviny je tvorba metastáz, tj. tvorba sekundárních nádorů. Jeden z nejkritičtějších kroků procesu tvorby metastáz je migrace buněk tkání z primárního nádoru, tato migrace se může konat dvěma způsoby mezenchymálním nebo ameboidním. Mezenchymální způsob pohybu je založen na extracelulární proteolýze okolní tkáně (shrnutí v Wolf a Friedl, 2004), ameboidní typ je založen na ameboidním pohybu, kdy buňka prolézá extracelulární matrix a generuje kontraktilní sílu, která deformuje vlákna extracelulární matrix (Wyckoff *et al.*, 2006). Ameboidní způsob pohybu je závislý na aktivaci ROCK kinázy. Důležitým znakem ameboidní migrace je tvorba membránových blebů (Sahai a Marshall, 2003), které jsou morfologicky obdobné blebům tvořících se během počáteční fáze apoptózy (viz obr.11) (Coleman *et al.*, 2001). Formování blebů je v obou případech závislé na fosforylaci lehkého řetězce myosinu (MLC) pomocí ROCK kinázy, a následné generaci akto-myosinové síly (Mills *et al.*, 1998; Coleman *et al.*, 2001; Sahai a Marshall, 2003). Exprese aktivní formy ROCK kinázy (bez C-koncové regulační domény) v neblebujících v neapoptotických Jurkat T buňkách vede u víc jak 80% transfekovaných buněk ke tvorbě blebů (Sebbagh *et al.*, 2001), což ukazuje, že zvýšená aktivita ROCK kinázy je postačující pro tvorbu blebů.



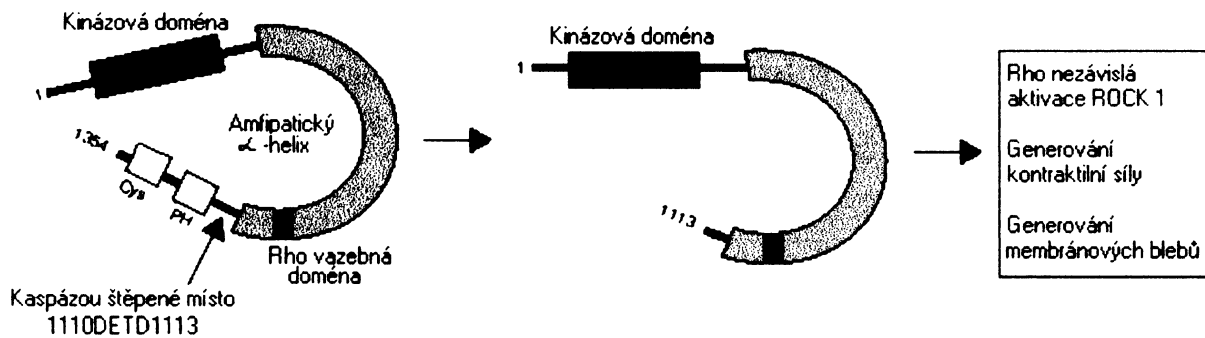
obr.11 Buňky s kulovitou morfologií a s přítomností dynamických blebů.

A) Mikroskopický snímek migrujících neapoptotických A375m2 melanomových buněk (převzato z Sahai a Marshall, 2003).

B) Mikroskopický snímek apoptotických NIH 3T3 fibroblastů (převzato z Coleman *et al.*, 2001).

Závislost tvorby blebů na ROCK kináze v takto odlišných situacích poskytuje potenciální možnost propojení apoptotických mechanismů s invazivitou. Je známo, že ROCK kináza je aktivována Rho GTPázou, která pravděpodobně odsune autoinhibiční C-koncovou doménu ROCKu od kinázové domény, tato konformační změna způsobí autofosforylaci a aktivaci ROCKu (Matsui *et al.*, 1996). ROCK kináza může být však aktivována i jiným způsobem, kaspázou zprostředkovaným odštěpením inhibiční C-koncové části ROCK kinázy (Coleman *et al.*, 2001; Sebbagh *et al.*, 2001). Během apoptózy kaspáza-3 štěpí ROCK-I isoformu² v místě DETD (1110-1113), tím odštěpí C-koncovou inhibiční doménu a ROCK-I kináza může být následně aktivována (viz obr.12) (Sebbagh *et al.*, 2001). Toto štěpení ROCK-I kinázy kaspázou-3 nebylo pozorováno pouze v prvních fázích apoptózy při formování blebů, ale i u hepatomových buněk MM1 neprocházejících apoptózou, a které mají invazivní schopnost (Mukai *et al.*, 2005). Bylo potvrzeno, že proapoptotickými signály zvýšená hladina kaspázy-3 v MM1 buňkách má vliv na štěpení a aktivaci ROCK kinázy, protože po přidání DEVD kaspázového inhibitoru štěpená aktivní forma ROCK kinázy přítomna nebyla, zatímco po přidání C3 inhibitoru Rho GTPázy se štěpená forma ROCK kinázy v buňce vyskytovala, a buňka tedy i po zablokování hlavního aktivátoru ROCK kinázy Rho GTPázy byla schopna migrace (Mukai *et al.*, 2005).

² ROCK-I isoforma je Rho GTPázou regulovaná serinová kináza; ještě existuje ROCK-II isoforma, což je threoninová kináza (Nakagawa *et al.*, 1996), která ovšem neobsahuje štěpné místo pro kaspázu-3 (Coleman *et al.*, 2001).



Obr.12 Rho nezávislá aktivace ROCK-1 kinázy pomocí kaspázy-3.

Červená šipka označuje místo štěpení kaspázou v pozici DETD (1110-1113), Cys=oblast bohatá na cystein, PH=doména homologní k pekstrinu, označeno je také místo, kam se váže Rho (Rho-binding domain) a kinázová doména na N-konci (převzato a upraveno z Coleman *et al.*, 2001).

Aktivace ROCK kinázy během apoptózy se děje hlavně pomocí kaspázy-3 (Sebbagh *et al.*, 2001). Rho regulace se na aktivaci ROCK kinázy v apoptóze výrazně nepodílí, důkazem je inhibitor ROCK kinázy Y-27632, který podstatně snižuje fosforylaci MLC, zatímco inhibitor C3 Rho GTPázy fosforylaci MLC výrazně nesnižuje (Sebbagh *et al.*, 2001). V některých buňkách, které apoptózou neprochází například u invazivních buněk, ROCK kináza může být aktivována jak Rho závislým způsobem, tak štěpením kaspázou (Mukai *et al.*, 2005). V PC12 buňkách je však ROCK kináza aktivována pouze Rho GTPázou, což bylo dokázáno tím, že po aplikaci inhibitoru C3 byla úplně inhibována membránová tvorba blebů, protože zde pravděpodobně chybí mechanismus, který by aktivaci ROCK kinázy mohl nahradit (Mills *et al.*, 1998).

2.2.4. LIMK-1 kináza je substrátem kaspázy-3

Na vzniku blebů se během apoptózy podílí nejen ROCK-1 kináza, ale i kináza LIMK-1 (Tomiyoši *et al.*, 2004). LIMK-1 je serinová kináza, která fosforyluje kofilin, a tím inaktivuje kofilinem zprostředkovanou fragmentaci F-aktinu (Arber *et al.*, 1998). LIMK kináza je aktivována ROCK kinázou (Ohashi *et al.*, 2000) a PAK kinázami (Edwards *et al.*, 1999). LIMK-1 je během apoptózy štěpena kaspázou-3 v sekvenci DEID (237-240). Takto štěpená forma LIMK-1 je aktivnější než forma neštěpená (Tomiyoši *et al.*, 2004). Exprese štěpené formy LIMK-1 (241-647 aminokyselin) v Jurkat T buňkách a v HeLa buňkách vede ke zvýšení počtu blebů, po inhibici LIMK siRNA se počet apoptotických blebů v Jurkat T buňkách sníží (Tomiyoši *et al.*, 2004). Skutečnost, že LIM-kináza se zúčastňuje tvorby blebů, a má inhibiční vliv na kofilin, podtrhuje její důležitost v buněčné migraci. Schopnost

kaspázy-3 štěpit a aktivovat LIMK během apoptózy dává této kaspáze potenciální možnost štěpit LIMK i v neapoptotických buňkách a přispívat tak k buněčné migraci nádorových buněk.

2.2.5. D4-GDI je substrátem kaspáz, a jeho hladina je zvýšena v některých nádorech

D4-GDI (Ly-GDI) patří do rodiny GDP disociačních inhibitorů Rho rodiny GTPáz. D4-GDI se může vázat na Rho-GDP proteiny a udržovat je tím v inaktivním stavu. Takovýto Rho/D4-GDI komplex není schopen vyměňovat GDP za GTP a je neschopný interagovat s dalšími regulačními proteiny (Olofsson, 1999). Rho rodina malých GTPáz, která zahrnuje Rac, Cdc42 a Rho, se účastní mimo jiné regulace mnoha buněčných procesů vedoucí k buněčné motilitě a invazivitě, jako je například organizace cytoskeletu, buněčná polarita a přenos signálů z extacelulárního prostředí. Zvýšená hladina exprese D4-GDI je přítomna u hematopoetických buněk a většina informací o D4-GDI byla získána z pokusů na těchto buňkách. Avšak nedávno se ukázalo, že velmi vysoká hladina D4-GDI je přítomna i ve vysoce invazivních buňkách například v buňkách lidského karcinomu prsu, a že množství D4-GDI inhibitoru v nich roste lineárně s mírou invazivity (Zhang a Zhang, 2006). Zvýšená hladina D4-GDI byla mimo jiné odhalena i v rakovinných buňkách močového měchýře (Theodorescu *et al.*, 2001) a vaječníků (Tapper *et al.*, 2001). Blokování exprese D4-GDI pomocí siRNA v MDA-MB-231 a BT549 buňkách rakoviny prsu inhibovalo buněčnou invazivitu těchto buněk a fenotyp invazivních buněk se změnil na normálně se vyvíjející prsní epitel (Zhang a Zhang, 2006). Zjištění, že nepřítomnost inhibitoru D4-GDI vyvolává ztrátu invazivity, kdy by teoreticky Rho GTPázy měly volné pole pro regulaci migrace a nebyly inhibovány D4-GDI, naznačuje, že by D4-GDI mohlo regulovat migraci buněk i jiným způsobem než standardně přes Rho-Rac-Cdc42 signální dráhu, nebo se v této kaskádě účastní způsobem, který dosud není ještě znám. Na invazivitě zprostředkované D4-GDI má pravděpodobně zásadní vliv β 1-integrin, jehož hladina i adhezivita buněk k podkladu se po snížení exprese D4-GDI podstatně snížila (Zhang a Zhang, 2006). Reexprese D4-GDI vedla jak ke zvýšení exprese β 1-integrinu, tak k obnovení migrační schopnosti buněk. Hladina exprese Rho rodiny GTPáz se po inhibici D4-GDI nezměnila, a snížení exprese D4-GDI nemá vliv ani na hladinu aktivované PAK kinázy (Zhang a Zhang, 2006), která je efektem Rho GTPáz (shrnuto v Zhao a Manser, 2005).

V hematopoetických buňkách bylo ukázáno, že D4-GDI je během apoptózy substrátem kaspázy-1 a kaspázy-3. Kaspáza-1 štěpí D4-GDI za Asp-54 (Danley *et al.*, 1996), druhá sekvence štěpená v Asp-19 je rozeznávána kaspázou-3 (Krieser a Eastman, 1999). Tyto sekvence nemusí být štěpeny zároveň ve všech typech buněk, například v HL-60 (lidské leukemické buňky) je D4-GDI štěpeno pouze kaspázou-3 (Kwon *et al.*, 2002) a v jiných hematopoetických buňkách v přítomnosti odlišných induktorů apoptózy je D4-GDI naopak štěpeno kaspázou-1 (Danley *et al.*, 1996). Kaspázy štěpí D4-GDI v místě, které je důležité pro efektivní regulaci Rho rodiny GTPáz, takto štěpený D4-GDI není schopný efektivně vázat a regulovat Rho rodinu GTPáz (Danley *et al.*, 1996). Nabízí se zde možnost, že kaspázou rozštěpená forma D4-GDI by se v buňce mohla chovat podobně, jako inhibice exprese D4-GDI v rakovinných buňkách prsu, a toto štěpení by mohlo mít tedy inhibiční vliv na migraci buněk.

2.2.6. Kaspáza-8 podporuje buněčnou migraci pravděpodobně přes aktivaci kalpainu

V mnoha nádorových buněčných liniích, jako například v rakovinných buňkách prsu a pankreatu, byla zjištěna vyšší hladina aktivované kaspázy-8 (Yang *et al.*, 2003). Tato zvýšená hladina kaspázy-8 může být způsobena různými faktory (shrnutí v Helfer *et al.*, 2006), ale poskytuje potenciální možnost, že kaspáza-8 může mít i neapoptotické funkce důležité ve vývoji nádorů. V mnoha různých buňkách je buněčná motilita závislá na aktivitě kalpainu, a nedávno bylo zjištěno, že kaspáza-8 tuto aktivaci podporuje (Helfer *et al.*, 2006). Kalpain je důležitý v migraci buněk z mnoha důvodů. Je zodpovědný za turnover adhezí, prodlužování a retrakci lamelopodií a aktivaci Rac GTPázy (Franco a Huttenlocher, 2005). Závislost motility na kalpainu byla potvrzena u MEF (myší embryonální fibroblasty) a WTNR6 buněk (myší fibroblasty), a u mnoha metastazujících buněk (shrnutí v Helfer *et al.*, 2006). Hladina kalpainu je v nádorových buňkách často výrazně zvýšena (Carragher *et al.*, 2004).

Inaktivace kaspázy-8 v MEF buňkách způsobuje snížení buněčné motility a nedostatečnou funkci proteázy kalpainu (Helfer *et al.*, 2006). Obdobně exprese virového inhibitoru kaspázy-8 crmA v MEF a WTNR6 buňkách vede také ke snížení migrace (Helfer *et al.*, 2006). Kaspáza-8 je iniciátorovou kaspázou, která aktivuje efektorovou kaspázu-3, která se jak už bylo zmíněno podílí na regulaci migrace buněk. Avšak inaktivace kaspázy-3 v MEF buňkách nezpůsobila pokles ani migrace ani aktivity kalpainu (Helfer *et al.*, 2006). Toto

zjištění ukazuje na možný přímý vliv kaspázy-8 na migraci buněk. Na význam kaspázy-8 v regulaci migrace ukazuje i to, že buňky deficientní na kaspázu-8 mají neefektivní aktivaci Rac GTPázy a nejsou schopny tvořit lamelopodia (Helfer *et al.*, 2006).

Přesný mechanismus jak kaspáza-8 aktivuje kalpain je dosud neznámý, ale je jisté, že v některých buněčných typech, které mají motilitu závislou na kalpainu, je kaspáza-8 významným regulátorem migrace jak normálních, tak nádorových buněk.

Závěr

Migrace buněk je velice důležitým procesem, na jejíž regulaci se podílejí i kaspázy. Na rozdíl od apoptotických buněk je hladina aktivních kaspáz během neapoptotického stavu buňky výrazněji nižší. Tato částečná aktivace kaspáz je pozorována mimo jiné u rakovinných buněk, které apoptózou neprocházejí, a které jsou charakteristické tím, že jsou schopny apoptóze odolávat. Aktivace kaspáz během neapoptotických stavů buňky musí být přísně regulována, aby tato částečná aktivace nevedla k apoptóze, ale například k buněčné migraci. Výsledky posledních let výzkumu ukazují, že na regulaci buněčné migrace mají vliv kaspáza-1, kaspáza-3, kaspáza-8 a kaspáza-11.

V imunitním systému je důležitá kaspáza-1, která podporuje aktivaci IL-1 β , a tím umožňuje Langerhansovým buňkám migraci do lymfatických uzlin. Další důležitou kaspázou imunitního systému je kaspáza-11, která se účastní regulace migrace lymfocytů do místa infekce. Kaspáza-11 zprostředkovává aktivaci fragmentaci vláknitého aktinu přes Aip1 protein a kofilin. V regulaci migrace rakovinných buněk má podstatnou roli kaspáza-3, která podporuje migraci přes aktivaci fosfolipázy A₂ (iPLA₂), nebo přes aktivaci ROCK-I kinázy. Kaspáza-3 může pravděpodobně inhibovat migraci buněk štěpením D4-GDI, tento inhibitor Rho GTPáz působí na migraci buněk způsobem, který dosud není znám. Kaspáza-8 je další kaspázou, která má vliv na migraci rakovinných buněk, neboť reguluje aktivaci kalpainu. Na aktivaci kalpainu je závislá motilita některých buněk. Přesný mechanismus aktivace kalpainu kaspázou-8 je však dosud neznámý.

Problematika buněčné migrace není prozatím plně objasněna, buněčná migrace může být regulována nepřeberným množstvím způsobů, a mimo jiné jsou v této regulaci zapojeny i kaspázy. Informace o vlivu kaspáz na regulaci migrace buněk jsou prozatím kusé, a jejich přesné mechanismy čekají prozatím na objevení.

Seznam použité literatury

Antonopoulos, C., Cumberbatch, M., Dearman, R. J., Daniel, R. J., Kimber, I., Groves, R. W. (2001). Functional caspase-1 is required for Langerhans cell migration and optimal contact sensitization in mice. *J. Immunol.* 166 (6), 3672-3677.

Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O., Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393 (6687), 805-809.

Atsumi, G., Murakami, M., Kojima, K., Hadano, A., Tajima, M., Kudo, I. (2000). Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A2 α inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 augments spontaneous fatty acid release. *J. Biol. Chem.* 275 (24), 18248-18258.

Balsinde, J., Balboa, M. A., Insel, P. A., Dennis, E. A. (1999). Regulation and inhibition of phospholipase A2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 175-189.

Carragher, N. O., Fonseca, B. D., Frame, M. C. (2004). Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological functions. *Neoplasia* 6 (1), 53–73.

Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., Olson, M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* 3 (4), 339-345.

Cumberbatch, M., Dearman, R. J., Kimber, I. (1997). Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor- α and interleukin-1 β for migration. *Immunology* 92 (3), 388-395.

Danley, D. E., Chuong, T. H., Bokoch, G. M. (1996). Defective Rho GTPase regulation by IL-1 β -converting enzyme-mediated cleavage of D4 GDP dissociation inhibitor. *J. Immunol.* 157 (2), 500-503.

Earnshaw, W. C., Martins, L. M., Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383-424.

Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M., Gill, G.N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signaling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* 1 (5), 253-259.

Enk, A. H., Katz S. I. (1992). Early events in the induction phase of contact sensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 99 (5), 39S-41S.

Franco, S. J., Huttenlocher, A. (2005). Regulating cell migration: calpains make the cut. *J. Cell Sci.* 118 (Pt-17), 3829-3838.

Fuentes-Prior, P., Salvesen, G. S. (2004). Review article. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* 384 (Pt 2), 201-232.

Helfer, B., Boswell, B. C., Finlay, D., Cipres, A., Vuori, K., Kang, T. B., Wallach, D., Dorfleutner, A., Lahti, J. M., Flynn, D. C., Frisch, S. M. (2006). Caspase-8 promotes cell motility and calpain activity under nonapoptotic conditions. *Cancer Res.* 66 (8), 4273-4278.

Chang, H. Y., Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (4), 821-846.

Kang, S. J., Wang, S., Hara, H., Peterson, E. P., Namura, S., Amin-Hanjani, S., Huang, Z., Srinivasan, A., Tomaselli, K. J., Thornberry, N. A., Moskowitz, M. A., Yuan, J. (2000). Dual role of caspase-11 in mediating activation of caspase-1 and caspase-3 under pathological conditions. *J. Cell Biol.* 149 (3), 613-622.

Kock, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J. C., Luger, T. A. (1990). Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor a evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J. Exp. Med.* 172 (6), 1609-1614.

Krieser, R. J., Eastman, A. (1999). Cleavage and nuclear translocation of the caspase-3 substrate Rho GDP-dissociation inhibitor, D4-GDI, during apoptosis. *Cell death differ.* 6 (5), 412-419.

Kwon, K. B., Park, E. K., Ryu, D. G., Park, B. H. (2002). D4-GDI is cleaved by caspase-3 during daunorubicin-induced apoptosis in HL-60 cells. *Exp. Mol. Med.* 34 (1), 32-37.

Lauber, K., Bohn, E., Krober, S. M., Xiao, Y. J., Blumenthal, S. G., Lindemann, R. K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., Xu, Y., Autenrieth, I. B., Schulze-Osthoff, K., Belka, C., Stuhler, G., Wesselborg, S. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113 (6), 717-730.

Li, J., Briher, W. M., Scimone, M. L., Kang, S. J., Zhu, H., Yin, H., von Andrian, U. H., Mitchison, T., Yuan, J. (2007). Caspase-11 regulates cell migration by promoting Aip1-Cofilin-mediated actin depolymerization. *Nat. Cell Biol.* 9 (3), 276-286.

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell.* 89 (2), 175-184.

Matsui, T., Matsuki, A., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 15 (9), 2208-2216.

Mills, J. C., Stone, N. L., Erhardt, J., Pittman, R. N. (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J. Cell Biol.* 140 (3), 627-636.

Mohri, K., Vorobiev, S., Fedorov, A. A., Almo, S. C., Ono, S. (2004). Identification of functional residues on *Caenorhabditis elegans* actin-interacting protein 1 (UNC-78) for disassembly of actin depolymerizing factor/cofilin-bound actin filaments. *J. Biol. Chem.* 279 (30), 31697-31707.

Mukai, M., Kusama, T., Hamanaka, Y., Koga, T., Endo, H., Tatsuta, M., Inoue, M. (2005). Cross talk between apoptosis and invasion signaling in cancer cells through caspase-3 activation. *Cancer Res.* 65 (20), 9121-9125.

Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K., Narumiya, S. (1996). ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.* 392 (2), 189-193.

Nhan, T. Q., Liles, W. C., Schwartz, S. M. (2006). Review. Physiological functions of caspases beyond cell death. *Am. J. Pathol.* 169 (3), 729-737.

O'Brien, M. A., Moravec, R. A., Riss, T. L. (2001). Poly (ADP-ribose) polymerase cleavage monitored in situ in apoptotic cells. *Biotechniques* 30 (4), 886-891.

Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S., Mizuno, K. (2000). Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J. Biol. Chem.* 275 (5), 3577-3582.

Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell. Signal.* 11 (8), 545-554.

Ono, S. (2003). Regulation of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: new blades for twisted filaments. *Biochemistry* 42 (46), 13363-13370.

Sahai, E., Marshall, C. J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat. Cell Biol.* 5 (8), 711-719.

Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J., Breard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell Biol.* 3 (4), 346-352.

Sengupta, S., Xiao, Y. J., Xu, Y. (2003). A novel laminin-induced LPA autocrine loop in the migration of ovarian cancer cells. *FASEB J.* 17 (11), 1570-1572.

Tang, J., Kriz, R. W., Wolfman, N., Shaffer, M., Seehra, J., Jones, S. S. (1997). A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A2 contains eight ankyrin motifs. *J. Biol. Chem.* 272 (13), 8567-8575.

Tapper, J., Kettunen, E., El-Rifai, W., Seppälä, M., Andersson, L. C., Knuutila, S. (2001). Changes in gene expression during progression of ovarian carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 128 (1), 1-6.

Theodorescu, D., Sapinoso, L. M., Conaway, M. R., Oxford, G., Hampton, G. M., Frierson, H. F. Jr. (2004). Reduced expression of metastasis suppressor RhoGDI2 is associated with decreased survival for patients with bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* 10 (11), 3800-3806.

Tomiyoshi, G., Horita, Y., Nishita, M., Ohashi, K., Mizuno, K. (2004). Caspase-mediated cleavage and activation of LIM-kinase 1 and its role in apoptotic membrane blebbing. *Genes Cells* 9 (6), 591-600.

Wang, S., Miura, M., Jung, Y., Zhu, H., Gagliardini, V., Shi, L., Greenberg, A. H., Yuan, J. (1996). Identification and characterization of Ich-3, a member of the interleukin-1 β converting enzyme (ICE)/Ced-3 family and an upstream regulator of ICE. *J. Biol. Chem.* 271 (34), 20580-20587.

Watanabe, Y., Akaike, T. (1999). Possible involvement of caspase-like family in maintenance of cytoskeleton integrity. *J. Cell Physiol.* 179 (1), 45-51.

Wolf, K., Friedl, P. (2004). Functional imaging of pericellular proteolysis in cancer cell invasion. *Biochemie* 87 (3-4), 315-320.

Wyckoff, J. B., Pinner, S. E., Gschmeissner, S., Condeelis, J. S., Sahai, E. (2006). ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr. Biol.* 16 (15), 1515-1523.

Yang, L., Cao, Z., Yan, H., Wood, W. C. (2003). Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res.* 63 (20), 6815-6824.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., Horvitz, H. M. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75 (4), 641-652.

Zhang, Y., Zhang, B. (2006). D4-GDI, a Rho GTPase regulator, promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer Res.* 66 (11), 5592-5598.

Zhao, X., Wang, D., Zhao, Z., Xiao, Y., Sengupta, S., Xiao, Y., Zhang, R., Lauber, K., Wesselborg, S., Feng, L., Rose, T. M., Shen, Y., Zhang, J., Prestwich, G., Xu, Y. (2006). Caspase-3-dependent activation of calcium-independent phospholipase A2 enhances cell migration in non-apoptotic ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* 281 (39), 29357-29368.

Zhao, Z., Manser, E. (2005). PAK and other Rho-associated kinases-effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem. J.* 386 (Pt 2), 201-214.