

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Disertační práce

**Molekulární mechanismy indukce
apoptosy u nádorových buněk**

Michal Koc

**Školitel: Doc. RNDr. Jan Kovář, DrSc.
Ústav molekulární genetiky AV ČR**

Praha 2007

Rád bych poděkoval všem, kteří mi umožnili vypracování této práce, za jejich podporu a pomoc.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	- 5 -
I. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	- 7 -
II. ÚVOD	- 8 -
II.1. Programovaná buněčná smrt a apoptosa	- 8 -
II.1.1. Programovaná buněčná smrt	- 8 -
II.1.2. Biologická role apoptosy	- 9 -
II.1.3. Molekulární mechanismy indukce apoptosy	- 10 -
II.1.4. Molekulární mechanismy exekuce apoptosy	- 15 -
II.2. Železo a apoptosa	- 18 -
II.2.1. Transport a metabolismus železa	- 18 -
II.2.2. Dostupnost železa a indukce apoptosy	- 20 -
II.2.3. Klinické využití indukce apoptosy deprivací železa	- 21 -
II.3. Taxany a apoptosa	- 23 -
II.3.1. Struktura, transport a metabolismus taxanů	- 23 -
II.3.2. Indukce apoptosy taxany	- 24 -
II.3.3. Klinické využití indukce apoptosy taxany	- 25 -
II.4. Porfyriny a apoptosa	- 27 -
II.4.1. PDT a porfyriny	- 27 -
II.4.2. Molekulární mechanismus indukce buněčné smrti porfyriny	- 28 -
II.4.3. Klinické využití fotodynamické terapie	- 30 -
III. KOMENTÁŘ K PRESENTOVANÝM PUBLIKACÍM	- 31 -
III.1. Indukce apoptosy deprivací železa	- 31 -
III.1.1. Indukce apoptosy deprivací železa zahrnuje translokaci Bax proteinu a následnou aktivaci mitochondriální dráhy	- 32 -
III.1.2. Sensitivita buněk k indukci apoptosy deprivací železa se reverzibilně mění v závislosti na dostupnosti železa	- 33 -
III.2. Transport železa	- 35 -
III.2.1. HSP90 je membránový železo vázající protein	- 35 -

III.3. Taxany a indukce apoptosy	- 37 -
III.3.1. Indukce buněčné smrti taxany vede k uvolnění cytochromu c z mitochondrií u resistantních, ale ne u sensitivních buněk	- 37 -
III.4. Porfyriny a indukce apoptosy	- 39 -
III.4.1. Nové deriváty porfyrinů a indukce apoptosy	- 39 -
IV. PRESENTOVANÉ PUBLIKACE	- 41 -
Koc M., Naďová Z., Truksa J., Ehrlichová M., Kovář J.: Iron deprivation induces apoptosis via mitochondrial changes related to Bax translocation. <i>Apoptosis</i> , 10 (2):381-93, 2005.	- 42 -
Koc M., Nadova Z., Kovar J.: Sensitivity of cells to apoptosis induced by iron deprivation can be reversibly changed by iron availability. <i>Cell Prolif.</i> , 39 : 551–561, 2006.	- 56 -
Kovář J., Štýbrová H., Novák P., Ehrlichová M., Truksa J., Koc M. , Kriegerbecková K., Scheiber-Mojdehkar B., Goldenberg H.: Heat shock protein 90 recognized as an iron-binding protein associated with the plasma membrane of HeLa cells. <i>Cell. Physiol. Biochem.</i> , 14 : 41-46, 2004.	- 68 -
Ehrlichová M., Koc M. , Truksa J., Naďová Z.: Cell death induced by taxanes in breast cancer cells: cytochrome C is released in resistant but not in sensitive cells. <i>Anticancer Res.</i> , 25 (6B): 4215-24, 2005.	- 75 -
Králová J, Synytsya A, Poučková P, Koc M , Dvořák M, Král V.: Novel porphyrin conjugates with a potent photodynamic antitumor effect: differential efficacy of mono- and bis-beta-cyclodextrin derivatives in vitro and in vivo. <i>Photochem Photobiol.</i> , 82 (2):432-8, 2006.	- 86 -
V. ZÁVĚR	- 93 -
VI. LITERATURA	- 95 -
VII. KONFERENCEČNÍ PŘÍSPĚVKY	- 111 -
VII.1. Přednášky	- 111 -
VII.2. Plakátové sdělení	- 112 -

Seznam použitých zkratek

ADD	addiction dependence domain
AIF	apoptosis inducing factor
Apaf-1	apoptosis activating factor 1
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATP	adenosine triphosphate
BIR	baculovirus IAP repeat
CARD	caspase recruitment domain
DCC	deleted in colorectal cancer
DD	death domain
DED	death effector domain
DFO	desferrioxamin
DISC	death inducing signaling complex
DMT1	divalent metal transporter 1
DNA	deoxyribonucleic acid
DR5	death receptor 5
EGF	epidermal growth factor
FADD	Fas associated death domain
FAK	focal adhesion kinase
FasL	Fas ligand
FLIP	FLICE inhibitory protein
HCP 1	heme carrier protein 1
Hdm2	human double minute 2
IAP	inhibitor of apoptotic proteins
ICAD	inhibitor of caspase-activated Dnase
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IRE	iron responsive element
IRP	iron regulatory protein
JNK/SAPK	Jun NH ₂ -terminal kinase/stress-activated protein kinase
MDR	multidrug resistance
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NGF	nerve growth factor

NGFR	nerve growth factor receptor
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase
PCD	programme cell death
PDGF	platelet derived growth factor
PDT	photodynamic therapy
PIDD	p53-induced protein with DD
PS	photosensitizer
PTP	permeability transition pore
RAID	RIP associated ICH1/CED3 homologous protein with DD
ROS	reactive oxygen species
tBid	truncated Bid
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TNF- α	tumor necrosis factor α
TRADD	TNFR associated via death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
VDAC	voltage dependent anion channel

I. Cíle disertační práce

V současné době je terapie řady nádorových onemocnění zatížena resistencí k jednotlivým protinádorovým léčivům. Jako účinný prostředek k překonání této resistance se ukazuje kombinace více postupů nebo léčiv s protinádorovým účinkem. Nutnou podmínkou pro takovou aplikaci protinádorových léčiv je dokonalá znalost mechanismu, kterým jednotlivá léčiva působí na buňky z důvodu vyhnutí se nežádoucím interakcím. Naším hlavním cílem proto bylo objasnění mechanismů indukce apoptosy různými induktory s ohledem na využití nových poznatků k zefektivnění nádorových terapií. V našich studiích jsme se zabývali mechanismem indukce apoptosy deprivací železa, taxany a novými fotosensitivními molekulami.

Jednotlivými cíly této práce bylo:

1. Přispět k pochopení molekulárního mechanismu indukce apoptosy deprivací železa a zároveň přispět k pochopení mechanismu odpovědného za resistenci nádorových buněk k deprivaci železa.
2. Identifikovat proteiny schopné vazby nízkomolekulárního železa s potenciální účastí v transportu nízkomolekulárního železa.
3. Přispět jednak k objasnění molekulárních mechanismů indukce apoptosy taxany a jednak k objasnění mechanismů zodpovědných za resistenci nebo sensitivitu nádorových buněk k taxanům. Konkrétně se zaměříme na klinicky používané taxany paclitaxel (Taxol[®]) a docetaxel (Taxotere[®]).
4. Charakterizovat, jakým způsobem ovlivní přítomnost atomů fluoru a jednoho nebo dvou cyklodextrinových substituentů fotosensitivní charakteristiky a účinnost nových derivátů porfyrinů (P(β -CD)1, P(β -CD)2) v indukci apoptosy u nádorových buněk *in vitro* a *in vivo*.

II. Úvod

II.1. Programovaná buněčná smrt a apoptosa

II.1.1. Programovaná buněčná smrt

Programovaná buněčná smrt (PCD) vyjadřuje buněčnou smrt, která se realizuje na základě specifických signálů ve vhodném čase a místě podle určitých mechanismů. V této souvislosti se tedy PCD uplatňuje u buněk již nepotřebných nebo u buněk určitým způsobem nebezpečných pro mnohobuněčný organismus jako celek. Termín “programovaný“ vystihuje jednak tu skutečnost, že konkrétní buňky odumírají cíleně v průběhu ontogenese, a také i tu skutečnost, že každá individuální buňka v mnohobuněčném organismu nese geneticky kódovanou informaci pro realizaci vlastní sebedestrukce. Jedním z typů PCD je apoptosa, jejíž základní molekulární průběh byl popsán na základě studia 131 buněk odumírajících během vývoje hlísta *Caenorhabditis elegans* (Bursch et al. 2000, Kinchen & Hengartner 2005, Kumar 2007).

Počátkem 70tých let, kdy došlo k objevu nového typu buněčné smrti, vypracoval Kerr et al. (1972) koncepci apoptosy. Tyto studie buněčné smrti dali vznik prvnímu popisu buněčné smrti na programovanou, označovanou “apoptosa“ a náhodnou označovanou “nekrosa“.

Termín apoptosa pochází ze složeniny dvou řeckých slov “apo“ a “ptosis“ znamenající odpadnout od něčeho. Apoptosa, narozdíl od nekrosy, je proces aktivní, který spotřebovává ATP. Během apoptosy dochází u umírajících buněk k morfologickým změnám (celkové smrštění, kondenzace chromatinu spojená s oligonukleosomovou fragmentací DNA), molekulárním změnám (exposice fosfatidylserinu na extracelulární straně cytoplasmatické membrány) a aktivaci specifických proteas (kaspasy). Konečnou fází apoptosy je tvorba malých membránou ohraničených apoptotických tělísek, které jsou následně pohlceny makrofágy nebo sousedními buňkami, aniž by došlo k vyvolání zánětlivé odpovědi imunitním systémem (Sen 1992, Vermeulen et al. 2005).

Oproti tomu nekrosa je morfologicky zcela odlišná. Během nekrosy dochází k nabobtnání jak celé buňky tak i mitochondrií a celý proces buněčné smrti probíhá bez spotřeby energie. Nedochozí zde ke kondenzaci chromatinu a štěpení DNA je náhodné.

Výsledkem nekrosy je porušení plasmatické membrány a uvolnění obsahu buňky do okolí, kde vyvolá zánětlivou odpověď imunitního systému (Proskuryakov et al. 2003).

S postupem času a získáváním nových informací se rozdělení typu buněčné smrti na apoptosu a nekrosu jeví jako příliš zjednodušené. V současnosti rozlišujeme buněčnou smrt na základě morfologie na apoptosu, nekrosu a autofagii. Nicméně existuje řada příkladů, kdy některé biochemické a morfologické charakteristiky zmíněných typů buněčné smrti mohou být nalezeny ve stejné buňce. To naznačuje přítomnost přechodných forem a klasická apoptosa a nekrosa tvoří mantinely tohoto rozložení (Bursch 2004, Fietta 2006, Bredesen 2007).

Další typ buněčné smrti, se kterým se setkáváme je zmíněná autofagie, také označovaná jako PCD typ II. Autofagie je evolučně konzervovaný proces, jehož indukce je pozorována v podmínkách hladovění a v některých patologických podmínkách jako jsou neuronální degenerace, infekční onemocnění a rakovina. Primární funkcí autofagie je recyklace proteinů z pohlcené cytoplasmy nebo poškozených organel do útvaru zvaný autofagosom, který posléze fúzuje s lysosomem. Avšak za určitých podmínek může tento proces vést až k buněčné smrti závislé nebo nezávislé na kaspasach (Gozuacik & Kimchi 2004, Yu et al. 2004, Debnath et al. 2005, Tsujimoto & Shimizu 2005, Kondo & Kondo 2006).

II.1.2. Biologická role apoptosy

Apoptosa hraje významnou úlohu v mnoha základních biologických procesech u mnohobuněčných organismů a to jak u živočichů, tak u rostlin. Její uplatnění můžeme najít ve fyziologických (udržení tkáňové homeostáze, ontogenese, regulace buněk imunitního systému, eliminace nebezpečných buněk) i v patologických procesech (neurodegenerativní onemocnění, svalové atrofie, nádorová onemocnění) (Matsson 2000, Lam et al. 2001, Alborian et al. 2003, Dickson 2004, Lam 2004, Hipfner & Cohen 2004, Dean et al. 2005).

Během ontogenese se apoptosa podílí na morfogenezi tkání. Dochází zde k odstranění celých skupin buněk (morfogenese prstů), struktur těla (ocas) s již nepotřebnou funkcí v určité etapě vývoje jedince a regresi orgánů (Jacobson et al. 1997, Meier et al. 2000).

Nezastupitelnou úlohu hraje apoptosa v imunitním systému, konkrétně ve zrání T a B lymfocytů a eliminaci pro organismus jako celek nebezpečných buněk. Při negativní selekci jsou eliminovány lymfocyty rozpoznávající antigeny tělu vlastní a při pozitivní selekci jsou eliminovány lymfocyty nevykazující odpověď proti patogením antigenům. Na druhou stranu zvýšená apoptosa buněk infikovaných HIV virem vede po několika letech k zdecimování imunitního systému (Falk et al. 2001, Pezzano et al. 2001, Rathmell & Thompson 2002, Testa 2004, Winau et al. 2004, Zahir & Weaver 2004).

Zásadní roli hraje apoptosa v udržování tkáňové homeostáze. Pro řádné fungování mnohobuněčného organismu je třeba udržovat základní rozvržení množství buněk tak, aby apoptosou eliminované buňky byly nahrazeny přibližně stejným množstvím buněk. V případě narušení této rovnováhy může dojít k hyperproliferaci tkáně, která může dát vznik nádorovým onemocněním. Na druhou stranu zvýšená frekvence indukce apoptosy hraje svou roli v několika typech degenerativních onemocnění jako jsou svalová atrofie, Alzheimerova a Parkinsonova choroba (Debatin 2004, Fennel & Rudd 2004, Holdenrieder & Stieber 2004, Porter & Dhakshinamoorthy 2004, Zahir & Weaver 2004).

Díky účasti apoptosy v mnoha fyziologických i patologických procesech se studium mechanismů indukce apoptosy dostalo do popředí vědeckého výzkumu pro možnost uplatnit získané poznatky v léčbě řady onemocnění. Velký důraz je zejména kladen na využití indukce apoptosy v léčbě nádorových onemocnění.

II.1.3. Molekulární mechanismy indukce apoptosy

Indukci apoptosy lze navodit širokým spektrem signálů počínaje ligandy pro specializované "receptory smrti" (FasL/CD95, TNF/TNFR, TRAIL/DR5), nedostatkem stimulačních faktorů nebo nutričních složek, stresem, nově syntetizovanými chemickými látkami nebo působením γ záření (Davireddy et al. 2001, Cornelis et al. 2005, Ehrlichová et al. 2005, Koc et al. 2005, Afshar et al. 2006, Corazza et al. 2006, Koul et al. 2006, Kralova et al. 2006, Lavrik et al. 2006, Matsubara et al. 2006, Wei et al. 2006, Zhou et al. 2006).

Indukce apoptosy se realizuje alespoň dvěma hlavními signálními dráhami "vnitřní" a "vnější". Každá z těchto signálních drah je regulována na více úrovních. Indukce apoptosy u "vnější" dráhy je zahajována na buněčném povrchu a to pomocí povrchových

receptorů a jim příslušných ligandů a posléze přenesením signálu indukce apoptosy dovnitř buňky na přidružené adaptorové proteiny. Regulace “vnější“ dráhy je zajišťována především expresí jednotlivých receptorů a inhibičních proteinů proteiny na intracelulární části receptorů (c-FLIP). “Vnitřní“ dráha je celkově směřována k mitochondriím, které obsahují klíčové faktory (cytochrom c, AIF, Smac/Diablo, Omi/HtrA2, endonukleasa G). Hlavním regulátorem “vnitřní“ dráhy jsou proteiny Bcl-2 rodiny.

Významné postavení v apoptose zaujímá protein p53, který jako regulátor apoptotických procesů může ovlivňovat řadu klíčových kontrolních bodů jak ve “vnější“ tak ve “vnitřní“ signální dráze. Za normálních podmínek je protein p53 rychle odbouráván a držen v nízké koncentraci negativním regulátorem Hdm2 (human double minute 2), který jako ubiquitin ligasa směřuje protein p53 do proteasomu. Aktivace proteinu p53 je spojena s odpovědí na vyvolaný stres (DNA poškození, hypoxie, oprava DNA, genomová nestabilita a jiné). V důsledku vyvolaného stresu dochází k fosforylaci a acetylaci proteinu p53. Aktivovaný p53 způsobí zablokování buněčného cyklu a následné spuštění opravných mechanismů nebo při nenapravitelném poškození směřuje buňku k indukci apoptosy. Poškození funkce proteinu p53 mutací, delecí nebo zesílenou degradací je proto jedna z vážných příčin vzniku nádorového onemocnění (Li et al. 2002, Fridman & Lowe 2003, Lavin & Gueven 2006).

Aktivovaný protein p53 působí jednak na úrovni regulace transkripce genů, tak na úrovni proteinových interakcí (Obr. 1.). Jako transkripční faktor indukuje nebo tlumí expresi genů účastnících se v apoptose (Sax & el-Deiry 2003). Jedním z významných proteinů indukovaných proteinem p53 jsou proapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny (Bax, Noxa, Bid, Puma) uplatňující se zejména v regulaci “vnitřní“ signální dráhy (Obr. 1.) (Miyashita & Reed 1995, Sax et al. 2002, Chipuk et al. 2004, Chipuk et al. 2005, Li et al. 2006). P53 rovněž indukuje exprese receptorů “vnější“ signální dráhy CD95/Fas a DR4, DR5 (Owen-Schaub et al. 1995, Takimoto & el-Deiry 2000, Guan et al. 2001).

Přímou interakcí protein p53 vyvazuje a tím inhibuje antiapoptotický protein Bcl-2, nebo vazbou k antiapoptotickému proteinu Mcl-1 umožní uvolnění proapoptotického proteinu Bak z inhibičního spojení s Mcl-1 (Leu et al. 2004, Deng et al. 2006, Tomita et al. 2006).

Zatímco protein p53 působí jako senzor zejména “vnitřní“ dráhy, povrchové receptory patří mezi senzory “vnější“ dráhy. Obecně tyto receptory účastnící se v indukci apoptosy nazýváme “receptory smrti“. Nejvýznamější z nich jsou zejména TNFR, FasR, DR4, DR5, jenž se vyznačují přítomností domén smrti (DD) na vnitrobuněčné části

receptoru. Pomocí adaptorových proteinů (FADD – fas associated death domain, TRADD –TNFR associated via death domain) se na tyto receptory vážou prokaspasy 8 a 10, které jsou následně v proteinovém komplexu aktivovány. Receptory po navázání trimerního ligandu změny konformaci a umožní vazbu adaptorovým proteinům. Dále jsou zde receptory označované “dependence receptory“, které naopak od “receptorů smrti“ indukují nebo amplifikují apoptotický signál v nepřítomnosti ligandu.

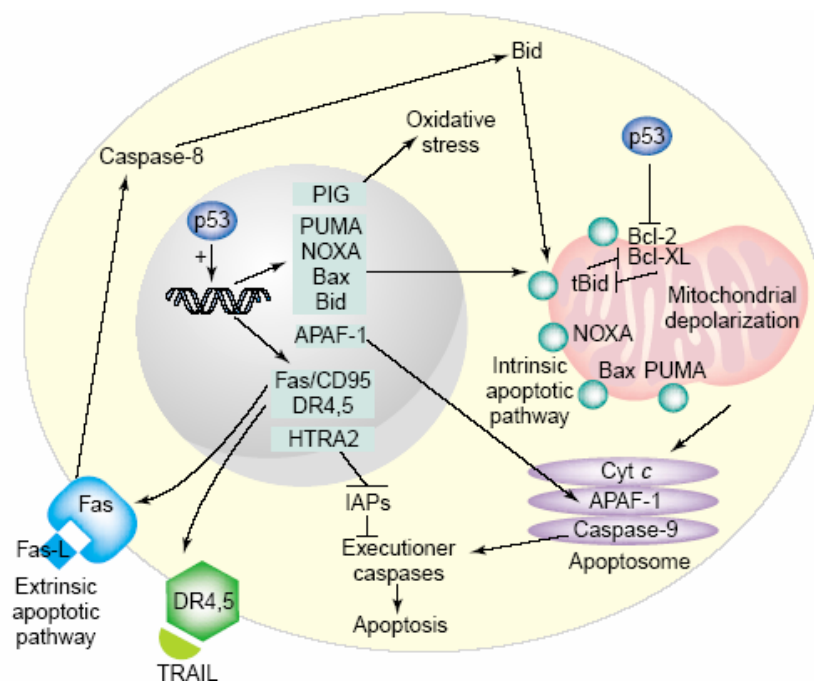
“Dependence receptory“ představují nehomogenní skupinu receptorů a většinou slouží pro vývoj nervového systému (např. ligand/receptor: Netrin-1/DCC-deleted in colorectal cancer, NGF/p75^{NTR}). Pro jejich apoptotickou funkci je nutná ADD doména (addiction dependence domain), umístěná na vnitrobuněčné části receptoru. V nepřítomnosti ligandů dochází kaspasou nebo jinou proteasou k odštěpení fragmentů právě s touto doménou, která je schopná řídit po své translokaci do mitochondriální membrány uvolnění cytochromu c z mitochondrií do cytosolu (Rabizadeh et al. 2000, Llambi et al. 2001, Mehlen & Thibert 2004). Kromě zmíněných receptorů jsou zde také receptory pro “survival“ faktory (NGFR, PDGF, EGF, IGF-1 at.), které naopak nepřímo potlačují apoptosu. V závislosti na podmínkách vedou signál k aktivaci Akt kinázy, která následně fosforyluje proapoptotické Bcl-2 proteiny a zabraňuje jim tak v jejich působení (Talapatra & Thompson 2001).

Mezi významné regulátory “vnitřní“ signální dráhy indukce apoptosy patří proteiny Bcl-2 rodiny. Proteiny Bcl-2 rodiny hrají klíčovou roli v homeostázy mitochondrií a endoplasmatického retikula. U mitochondrií regulují integritu vnější mitochondriální membrány a otevírání PTP pórů (Permeability Transition Pore), což má za následek uvolnění proteinů podporující apoptosu (cytochrom c, AIF, Smac/DIABLO, endonukleasa G). Kromě zmíněného otevírání PTP pórů může docházet k uvolňování mitochondriálních proteinů na základě tvorby kanálů tvořených proapoptotickým proteinem Bax, případně za pomoci kaspasou 8 štěpeného tBid. U endoplasmatického retikula regulují uvolnění vápenatých iontů a aktivaci kaspasy 12 (Cory & Adams 2002, Kuwana et al. 2002, Scorrano et al. 2003, Sharpe et al. 2004, Andersen et al. 2005, Li et al. 2006, Shoshan-Barmatz et al. 2006, Yin 2006).

Proteiny Bcl-2 rodiny můžeme rozdělit do dvou skupin podle jejich působení v apoptose, proapoptotické (Bax, Bad, Bid, Bim, Bik, Noxa, Puma) a antiapoptotické (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1) členy. Společným rysem těchto proteinů je přítomnost BH domény. Jednotliví zástupci Bcl-2 rodiny mohou mezi sebou interagovat a vyvazovat tak antiapoptotické zástupce proapoptotickými nebo obráceně podle momentálního zastoupení

v buňce (Willis et al. 2007). Kromě možnosti vypárování jednotlivých členů Bcl-2 rodiny se můžeme setkat s další formou regulace proteinů Bcl-2. Na transkripční úrovni je to proteinem p53 indukovaná exprese Bax, Puma, Noxa a na postranlační úpravě fosforylace Bad a štěpení Bid iniciační kaspasou-8 (Cheng et al. 2001, Werner et al. 2002, Petros et al. 2004, Schinzel et al. 2004, Kim et al. 2006).

Kromě klíčové role mitochondrií se v apoptotické smrti uplatňují i endoplasmatické retikulum a lysosomy. Otevření vápenatých kanálů v ER vede ke zvýšení hladiny Ca^{2+} v cytosolu a následné aktivaci proteasy označované calpain. Calpain je syntetizován v zymogenní formě a v přítomnosti Ca^{2+} dochází k autokatalytické proteolytické aktivaci. Aktivovaná proteasa následně štěpí a inaktivuje Bcl-x_L a inhibitor kaspas XIAP nebo proteolytickou úpravou aktivuje kaspasu 12 a proapoptotický Bid (Nagakawa et al. 2000, Nagakawa & Yuan 2000, Kobayashi et al. 2002, Mandic et al. 2002).



Obr. 1. Schématický obrázek signálních drah účastníci se indukce apoptosy zprostředkovaných proteinem p53.

(Podle Hofseth et al. 2004)

Další důležitou organelou působící v PCD je lysosom účastnící se jak apoptosy tak nekrosy. Klíčovým krokem, který určuje výsledný program buněčné smrti (apoptosa či nekrosa) závisí na míře permeabilizace lysosomu a tím i na množství proteolytických enzymů uvolněných do cytosolu. "Lysosomální dráha" se primárně uplatňuje v patologických neurodegenerativních procesech (Lieuallen et al. 2001, Houseweart et al. 2003). Dále lze "lysosomální dráhu" indukovat UV zářením a aplikací fotosensitivních látek kumulujících se v lysosomech (fotodynamická terapie) (Boya et al. 2003).

Prvotním krokem spuštění lysosomální dráhy je permeabilizace lysosomální membrány. Mechanismus jakým dochází k destabilizaci lysosomů není zcela jasný, přesto jsou navrženy tři modely. V prvním modelu se předpokládá účast sfingosinu, který díky kyselému prostředí lysosomu získává detergentní a lysosomotropní vlastnosti. Akumulovaný vnitrobuněčný sfingosin způsobí částečné porušení lysosomů v buňce a následnou na kaspasach závislou apoptosu, nebo v závislosti na výši koncentrace sfingosinu může dojít až k totálnímu porušení všech lysosomů a následně na kaspasach nezávislé nekrose (Kagedal et al. 2001, Guicciardi & Gores 2004, Tardy et al. 2006). Alternativní možností permeabilizace lysosomu spočívá v poškození lysosomální membrány reaktivními kyslíkovými radikály (ROS). Vystavení buněk oxidativnímu stresu peroxidem vodíku vedlo k porušení membrán lysosomů nepřímo aktivací fosfolipasy A2 (PLA2), která může destabilizovat membrány vnitrobuněčných organel degradací membránových fosfolipidů. Mimoto u řady takových induktorů apoptosy jako je TNF- α (Tumor Necrosis Factor), u nichž dochází k účasti "lysosomální dráhy" byla také zaznamenána zesílená produkce vnitrobuněčného peroxidu vodíku během apoptotického procesu (Manna et al. 1998, Dare et al. 2001, Ferri & Kroemer 2001, Zhao et al. 2001, Yin et al. 2005). Poslední možností jak porušit integritu lysosomů je translokace proapoptotických členů Bcl-2 rodiny do lysosomální membrány, nicméně pro tuto teorii existuje nejméně důkazů. Dosud byla zmíněna pouze jedna práce ukazující translokaci Bax proteinu na lysosomy a následné vyplavení lysosomálních proteinů do cytosolu (Kagedal et al. 2005).

Lysosomální cysteinové proteasy označované jako catepsiny reprezentují největší složku proteolytických enzymů v lysosomu, z nichž catepsin B, L a D jsou nejvíce zastoupeny. Uvolněné catepsiny jsou schopné štěpit kaspasy, nicméně pouze ty, které se

účastní pouze úpravy zánětlivých cytokinů a ne apoptotického procesu (Schotte et al. 1998, Vancompernelle et al. 1998, Stoka et al. 2001).

Zdá se, že k samotnému uvolnění lysosomálního obsahu nemusí docházet pouze v exekuční fázi apoptosy, ale místo toho může být současné nebo dokonce předcházet poškození mitochondrií způsobené translokací proapoptotických členů Bcl-2 rodiny. Ukázalo se, že řada induktorů vyvolávajících uvolnění catepsinu D aktivuje Bax a Bak translokaci na mitochondrie, kterou lze zablokovat inhibitory catepsinů (Bidere et al. 2003, Boya et al. 2003). Proapoptotický protein Bid je rovněž štěpen a aktivován catepsinem B, avšak místo štěpení se liší od kaspasy 8 a granzymu B (Stoka et al. 2001, Cirman et al. 2004).

II.1.4. Molekulární mechanismy exekuce apoptosy

V indukci apoptosy působí několik signálních drah, které na základě převahy apoptotických nebo antiapoptotických regulačních proteinů směřují nebo naopak zablokují přechod buňky do závěrečné fáze indukce apoptosy. V závěrečné fázi indukce apoptosy jsou aktivovány exekuční proteasy nazývané kaspasy. Kaspasy můžeme rozdělit do dvou skupin podle procesů, kterých se účastní. Většina kaspas se uplatňuje v apoptotickém procesu a menší část je zodpovědná za proteolytickou úpravu cytokinů (Festjens et al. 2006, Kuranaga & Miura 2007, Lamkanfi et al. 2007)

Kaspasy jsou cysteinové proteasy štěpící za kyselinou asparagovou. Všechny jsou syntetisovány v neaktivní formě zymogenu a označeny jako prokaspasy. K jejich aktivaci je zapotřebí proteolytického rozštěpení prokaspasy na malou a velkou podjednotku. Aktivní kaspasa je poté složený tetramer z dvou malých a dvou velkých podjednotek. Na základě jejich struktury, která zároveň odráží i jejich postavení v signální kaskádě, můžeme apoptotické kaspasy rozdělit do dvou skupin (Earnshaw et al. 1999, Stennicke & Salvesen 2000, Donepudi & Grutter 2002).

První skupinu tvoří iniciační kaspasy 2, 8, 9, 10. Ty se od exekučních kaspas liší zejména přítomností dlouhé N-koncové prodomény a v ní obsažených DED (death effector domain) a CARD (caspase recruitment domain). N-koncová prodoména slouží k aktivaci iniciačních kaspas. Jsou známy tři modely, jak se iniciační kaspasy aktivují (Shi 2004).

Jeden model kaspasové aktivace je založen na přiblížení kaspas za účasti “receptorů smrti“. V tomto modelu jsou prokaspasa 8 a 10 navázány ke ztrimerizovanému receptoru smrti zprostředkovaně přes adaptorový protein FADD (Fas associated death domain). Po vazbě ligandu dojde k vytvoření komplexu receptor, adaptorový protein a prokaspasa označovaný jako DISC (death inducing signaling complex), který umožní proteolytickou úpravu prokaspasy na aktivní formu (Obr. 2.) (Kischkel et al. 2000, Sprick et al. 2002, Curtin & Cotter 2003, Milhas et al. 2005).

V druhém modelu dochází k aktivaci prokaspasy 9 v proteinovém komplexu označovaném jako “apoptosom“. Prokaspasa 9 je navázána k proteinu Apaf-1 (apoptosis activating factor 1) přes CARD doménu. K této doméně se prokaspasa 9 může dostat pouze v případě změny konformace, která je způsobena přítomností cytochromu c a ATP. Cytochrom c je standardně lokalizovaný v mitochondriích a pouze v případě destabilizace mitochondrií dochází k jeho uvolnění a následné aktivaci kaspasy 9 v apoptosomu (Obr. 2.) (Adams & Cory 2002, Creagh et al. 2003, Bao & Shi 2007).

V třetím modelu je aktivována kaspasa 2 v proteinovém komplexu označovaném jako “piddisom“. Prokaspasa 2 interaguje svojí CARD doménou s CARD doménou adaptorového proteinu RAID (RIP associated ICH1/CED3 homologous protein with DD). RAIDD se posléze váže přes svojí DD doménu k PIDD (p53-induced protein with DD) proteinu, jehož exprese je indukována v odpovědi na stres proteinem p53. K aktivaci kaspasy 2 není nutná její proteolytická úprava jako u ostatních kaspas, ale pouze její dimerizace s jinou kaspasou 2. Autokatalytická úprava kaspasy 2 je posléze důsledek dimerizace (Obr. 2.) (Baliga et al. 2004, Tinel & Tschopp 2004).

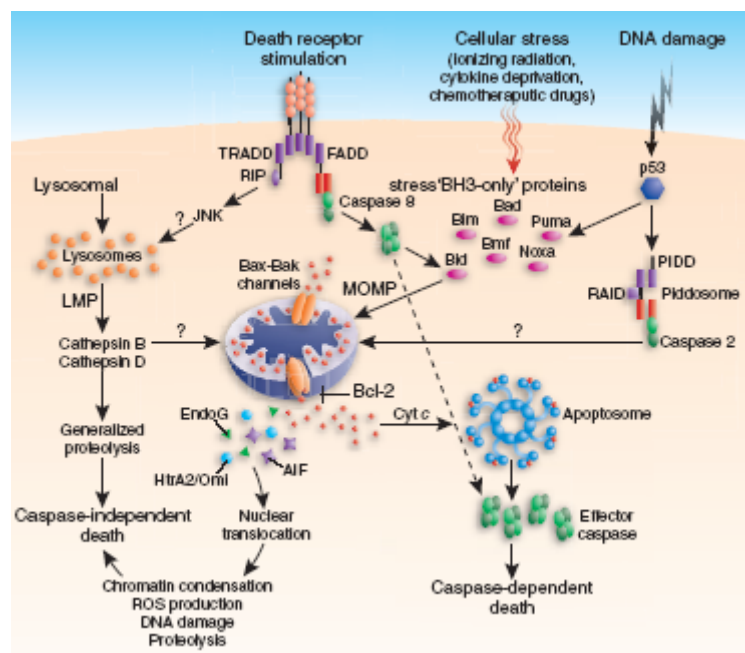
Druhou skupinu tvoří exekuční kaspasy 3, 6, 7 působící na konci signální kaskády. Exekuční kaspasy jsou aktivovány aktivními iniciačními kaspasami nebo jinými proteasami jako je granzym B (Creagh et al. 2003, Trapani & Sutton 2003).

Aktivní exekuční kaspasy štěpí řadu proteinů označovaných jako “substráty smrti“, jenž vede ke zrušení funkce těchto proteinů nebo naopak k aktivaci do té doby inhibovaných proteinů. Mezi “substráty smrti“ patří apoptotické regulátory (Bid, FLIP, XIAP, Bcl-2, kaspasy), proteiny cytoskeletu a buněčné adheze (FAK-focal adhesion kinase, cadheriny, actiny, filamin, spectrin, vimentin, jaderné laminy, nucleoporiny), proteiny buněčného cyklu (cycliny, Rb, p21, p27, Hdm2), proteiny DNA metabolismu (PARP-poly(ADP-ribose) polymerase-2, ATM-Ataxia telangiectasia mutated protein, ICAD-Inhibitor of caspase-activated DNase, Topo-isomerázy, XRCC-X-ray repair, complementing defective), transkripční faktory, proteiny RNA metabolismu (NFkB, Sp1;

hnRNPs), cytokiny, kinazy (Fyn, Lyn, AKT, MEK, Mst 1-3, PKCs, RIP) (Fischer et al. 2003, Timmer & Salvesen 2007).

Aktivované kaspasy lze stále regulovat jejich inhibitory. Inhibice je buď přímá do katalytického místa, nebo nepřímá vyvazováním adaptorových proteinů. Vnitrobuněčné regulátory kaspas patří do IAPs rodiny (inhibitors of apoptosis). Charakteristickým prvkem těchto proteinů je přítomnost jejich BIR sekvencí (baculovirus IAP repeat) nutných k jejich funkci. Tyto inhibitory mohou být negativně regulovány mitochondriálními proteiny SMAC/Diablo nebo rozštěpeny proteasou Omi/HtrA2 (Srinivasula et al. 2000, Salvesen & Duckett 2002, van Loo et al. 2002, Song et al. 2003, Scott et al. 2005).

Samotná inhibice kaspas často nezabrání buněčné smrti, ale posune ji do procesu nezávislého na kaspasach. Důvodem je jednak zesílení signálu smrti jinými proteiny, které mohou působit souběžně s kaspasami (cathepsin, calpain). Navíc, během regulační fáze apoptosy dochází k nevratnému poškození mitochondrií, kde společně s cytochromem c jsou uvolněny i endonukleasy AIF a endonukleasa G. Spolu s nimi mohou v závěrečné fázi působit i jiné proteasy jako granzym B a Omi/HtrA2 (Kroemer & Martin 2005, Furre et al. 2006).



Obr. 2 Schématický obrázek znázorňující signalizaci vedoucí k aktivaci kaspas a účast dalších proteinů v exekuční fázi apoptosy.

(Podle Kroemer & Martin 2005)

II.2. Železo a apoptosa

II.2.1. Transport a metabolismus železa

Eukaryotická, ale i většina prokaryotických buněk vyžaduje železo jako základní součást hemoproteinů, proteinů obsahujících Fe-S klastry a řady proteinů zajišťujících nezbytné funkce v buněčném metabolismu pro své přežití a buněčnou proliferaci (Le & Richardson 2002, Rees & Howard 2003, Hentze et al. 2004, Andrews & Schmidt 2007). Železo je redoxně reaktivní prvek vyskytující se ve dvou oxidativně redukčních stavech Fe^{2+} a Fe^{3+} . Tyto jeho chemické vlastnosti ho zároveň dělají nebezpečným pro buňku. V cytoplasmě je většina železa ve formě Fe^{2+} a může se tak účastnit Fentonovy reakce, kdy při reakci s peroxidem vodíku vzniká Fe^{3+} společně s reaktivním hydroxylovým radikálem, který poškozují lipidové membrány, proteiny a nukleové kyseliny. Proto jak nedostatek, tak přesycení buněčným železem může způsobovat buněčnou smrt a je tedy žádoucí řádná regulace buněčného železa (Kruszewski 2003, Hentze et al. 2004).

Přesto, že se železo nachází v přírodě ve velkém množství, není pro organismy snadné ho získat zejména díky extrémně nízké rozpustnosti jeho stabilní Fe^{3+} formy ve vodném prostředí při fyziologickém pH. Proto byly organismy donuceny vyvinout účinné mechanismy pro transport a skladování železa. Pro transport této formy obratlovci a někteří nižší organismy vyvinuly transportní protein transferin. Menší množství železa je transportováno ve formě nízkomolekulárních chelátů. Většina nízkomolekulárního železa v plasmě je vázána v citrátu železitém (Sarkar 1970, Grootveld et al. 1989).

Výlučný způsob příjmu anorganického a hemového železa z potravy je v proximální části tenkého střeva polarizovanými buňkami epitelu enterocyty. Absorbce hemového železa enterocyty je účinnější než absorbce anorganického železa. Hemové železo je transportováno pomocí aktivity HCP 1 (heme carrier protein 1) proteinu, nicméně samotný metabolismus hemového železa není zcela objasněn (Obr. 3.) (Shayeghi et al. 2005).

Polarizovaný enterocyt obsahuje na obou stranách komplex transportéru a enzymu měnící oxidační stav železa. Pro příjem železa z lumen střeva vlastní enterocyt ferrireduktasu železa Dcyt b redukuje Fe^{3+} na Fe^{2+} (Obr. 3.). Nicméně skutečnost, že myši bez tohoto enzymu nevykazovali žádný deficit železa, naznačuje existenci jiné reduktasy železa. Dvojmocné železo je posléze transportováno přes plasmatickou membránu

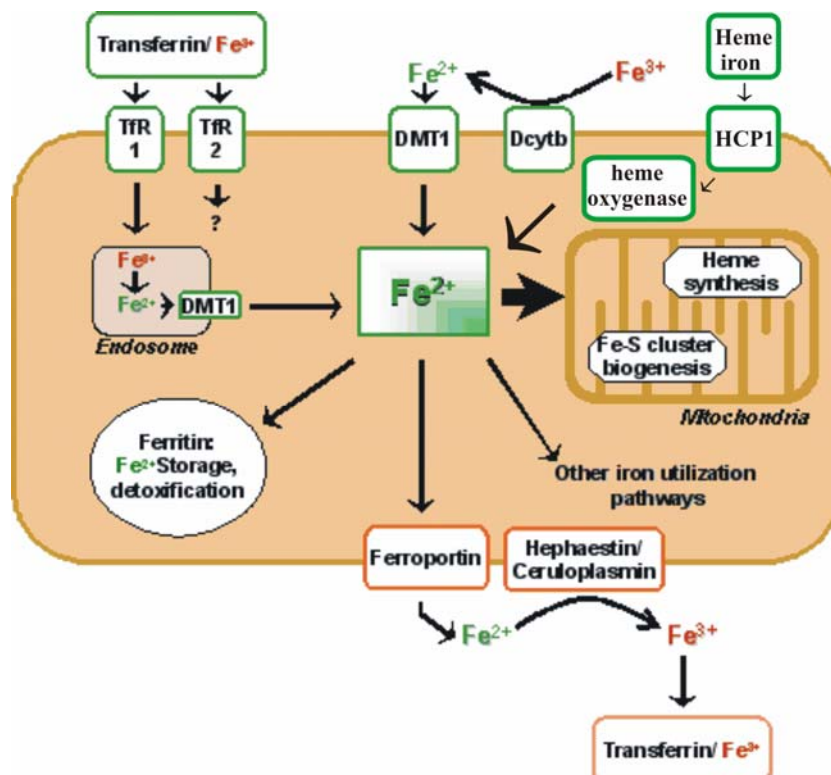
transportérem DMT1 (divalent metal transporter 1), patřící do rodiny Nramp (Obr. 3.) (Hentze et al. 2004, Gunshin et al. 2005, Andrews & Schmidt 2007).

Pro bazolaterální přenos železa z enterocytu do tělní cirkulace je nezbytný ferroportin, dále však taky pro maternálně-embryonální přenos a export železa z tkáně makrofágů. Podobně jako DMT1 přenáší ferroportin dvojmocné železo, které je posléze oxidováno přidruženou ferroxidasou železa heaphestinem nebo ceruloplasminem. Uvolněný Fe^{3+} je následně navázán na sérový protein transferin, který zajišťuje většinu distribuce železa po těle (Obr. 3.) (Vulpe et al. 1999, Ganz 2005, Cherukuri et al. 2005).

Savčí buňky exprimují dvě formy transferinového receptoru a to TfR1 a TfR2. Transferin má větší afinitu k TfR1 než k TfR2 (Kawabata et al., 1999, Kawabata et al. 2000). Tento komplex je poté internalizován receptorem zprostředkovanou endocytosou. K uvolnění Fe^{3+} z transferinu dojde až v kyselém prostředí endosomu. Železo přenesené z endosomu do cytoplasmy DMT1 transportérem je následně inkorporováno do železo obsahujících proteinů nebo je skladováno pro pozdější využití ve ferritinu (Obr. 3.).

Homeostáze vnitrobuněčného železa je převážně řízena dvěma mRNA vázajícími proteiny označovanými jako IRP1 (Iron Regulatory Protein1) a IRP2. Molekuly mRNA určitých proteinů účastnící se v metabolismu železa (ferritin, TfR1, Nramp2) obsahují ve své mRNA IRE (Iron Responsive Element) úseky. IRE se vyskytuje buď v 3' nepřekládané nebo v 5' nepřekládané oblasti mRNA (Hentze & Kuhn, 1996, Richardson & Ponka, 1997, Le & Richardson, 2002). Regulace IRP proteiny spočívá v jejich schopnosti vázat se k IRE. V případě vazby na 3' konec dochází ke stabilizaci mRNA proti degradaci zatímco vazbou na IRE v 5' konci dochází k inhibici translace dané mRNA. Ferritin má IRE úsek lokalizovaný v 5' nepřekládané oblasti, TfR1 a Nramp na 3' konci (Le & Richardson, 2002).

Samotný IRP1 při vysoké hladině železa v buňce funguje jako cytosolická akonitasa a jeho afinita k IRE s vyšší hladinou železa v buňce klesá, zatímco při poklesu vnitrobuněčné hladiny železa stoupne afinita IRP1 k IRE. Regulace IRP2 je založena na jiném principu. Při nízkých hladinách vnitrobuněčného železa je IRP2 syntetizován de novo, zatímco se zvyšující se hladinou vnitrobuněčného železa je degradován ubiquitinací (Kaptain et al. 1991, Emery-Goodman et al. 1993, Kim & Ponka 2000).



Obr. 3. Schématický nákres transportu železa.

(Upravený podle Hentze et al. 2004)

II.2.2. Dostupnost železa a indukce apoptosy

Deprivace železa, ale i jeho nadbytek mohou způsobit indukci apoptosy nebo alespoň pozměnit odpověď na indukci apoptosy jinými stimuly (Fukuchi et al. 1994, Porter et al. 1994, Fukuchi et al. 1995, Haq et al. 1995, Hileti et al. 1995, Kovář et al. 1997a, Ido et al. 1999, Kim et al. 2000, Abeysinghe et al. 2001, Kovář et al. 2001, Jiang et al. 2002, Kotamraju et al. 2002, Cozzi et al. 2003, Truksa et al. 2003, Kotamraju et al. 2004, Schlawe et al. 2004, Davireddy et al. 2005, Lee et al. 2006a,b, Ng et al. 2006). Mechanismy indukce apoptosy deprivací železa nejsou stále přesně pochopeny, navíc se zdá, že se mohou lišit v závislosti na buněčné linii a způsobu jakou byla deprivace železa dosažena.

Pro navození deprivace železa jsou ve většině studií používány chelatátory železa jako DFO (desferrioxamin), o-trensox, hinokitol, tachpyrin a pyridoxal isonicotinoyl

hydrazone deriváty. Nicméně je známo, že tyto chelátory mohou vázat kromě železa i vnitrobuněčný zinek. Kromě chelátorů železa, používají některé studie protilátky proti transferinovému receptoru (Fukuchi et al. 1994, Porter et al. 1994, Fukuchi et al. 1995, Haq et al. 1995, MacLean et al. 2001, Buss et al. 2003, Yuan et al. 2004, Zhao et al. 2004, Brard et al. 2006, Lee et al. 2006a, Ng et al. 2006).

V naší laboratoři pro navození deprivace železa používáme snadno kontrolovatelný model chemicky definovaných bezsérových médií, kde deprivaci železa navodíme odebráním saturovaného transferinu nebo citrátu železitého jako jediného zdroje železa (Kovář et al. 1997a, Kovář et al. 2001, Truksa et al. 2003, Koc et al. 2005, Koc et al. 2006).

Publikovaná data ukazují na mechanismus závislý i nezávislý na proteinu p53, který vede k translokaci apoptotického proteinu Bax do mitochondriální membrány a následnému vylití cytochrome c do cytosolu. Dále rovněž docházelo k aktivaci kaspas 3, 9, 8, nicméně buněčná smrt nebyla inhibitory kaspas zcela zablokována (Truksa et al. 2003, Koc et al. 2005, Brard et al. 2006, Lee et al. 2006b, Ng et al. 2006).

Další studie ukázali na možnost účasti kináz p38 a ERK-1, -2, které jsou po aplikaci chelátorů železa fosforylovány a následkem jejich aktivace docházelo k uvolnění cytochromu c z mitochondrií (Kim et al. 2002, Lee et al. 2006a).

Nedávno byly identifikovány systémy receptor/ligand (myšší 24p3/24p3R a lidský NGAL/NGALR) schopné vyvolat deprivaci železa v buňce. Tyto ligandy byly internalizovány do buňky, ať už byl nebo nebyl ligand nasycený železem. V případě nenasyčeného ligandu docházelo k vyvázání buněčného železa na ligand a jeho uvolnění ven z buňky. Následná deprivace železa vedla k zvýšené expresi a aktivaci proapoptotického proteinu Bim (Devireddy et al. 2005).

II.2.3. Klinické využití indukce apoptosy deprivací železa

Ukázalo se, že některé typy nádorů (nádory prsu, močového měchýře, prostaty, leukemie, neuroblastomy a lymfomy) zvyšují expresi transferinového receptoru pro pokrytí narůstající potřeby železa (Faulk et al. 1980, Sutherland et al. 1981, Keer et al. 1990, Basar et al. 1991). Zvýšená potřeba železa u nádorových buněk proto vedla k úvahám o použití deprivace železa v nádorové terapii. V protinádorové léčbě byli

doposud aplikovány tyto strategie deprivace železa: (1) použití galitých solí, (2) použití chelátorů železa a (3) použití protilátek proti transferinovému receptoru nebo jejich vzájemné kombinace.

Trojmocné galium je schopné inhibice růstu nádorů převážně díky jeho blízké podobnosti s trojmocným železem. Jeho účinek spočívá v silné kompetitivní vazbě k transferinu a dále v jeho interakci s ribonukleotid reduktasou, enzymem závislým na železe. Nefunkčnost tohoto enzymu posléze vede k nedostatečné zásobě dNTP a následné inhibici DNA syntézy. V současnosti jsou testovány nově připravované komplexy s galiem pro efektivní účinnou orální aplikaci a to zejména proti lymfomům a nádoru močového měchýře (Chitambar 2004a, Chitambar 2004b, Jakupec & Keppler 2004, Rudnev et al.2006).

Vysokoafinitní nízkomolekulární chelátory železa nabízejí přímou metodu deprivace buněčného železa. Nejvíce studií používajících chelátory železa se zaměřilo na DFO (deferroxamin), který je primárně používán v léčbě nemocí s nadměrnou kumulací železa v těle. Ačkoliv bylo prokázána jeho schopnost potlačit růst nádorů v klinických zkouškách, jeho účinnost byla limitována slabou prostupností plasmatickou membránou a vyvázáním buněčného železa. Tyto omezení vedli k syntéze a testování mnoha nových chelátorů železa s větší účinností než DFO jako jsou Triapine, Pyridoxal, isonicotinoyl hydrazone, O-Trensox, desferrithiocin, desferrixochelin, di-2-pyridyl thiosemicarbazones a tachpyridin (Richardson 1998, Rakba et al. 2000, Kicic et al. 2001, Feun et al. 2002, Chong et al. 2002, Buss et al. 2004, Yuan et al. 2004, Turner et al. 2005).

Dalším přístupem je zablokování transferinového receptoru (TfR) monoklonálními protilátkami. Bylo prokázáno, že kombinací více protilátek nebo i v kombinaci s DFO docházelo k inhibici proliferace nádorových buněk. Navíc konstrukcí chimerních protilátek proti TfR použitím lidského Fc fragmentu může být snížena antigenicita protilátek a zesílen protinádorový účinek (Kemp et al. 1992, Kemp et al. 1995, Moura et al. 2004, Qing et al. 2006).

Je tedy zřejmé, že deprivace železa představuje slibný prostředek protinádorové léčby s možností dalšího rozvíjení zmíněných přístupů.

II.3. Taxany a apoptosa

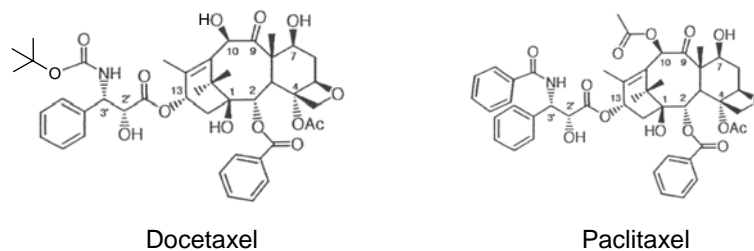
II.3.1. Struktura, transport a metabolismus taxanů

Taxany reprezentují novou skupinu protinádorových léčiv. Klinicky používané taxany jsou paclitaxel (Taxol[®]) a docetaxel (Taxotere[®]) (Obr. 4.) (Geney et al. 2002). Paclitaxel byl původně izolován z kůry tisu *Taxus brevifolia* zatímco docetaxel reprezentuje semisyntetický produkt z prekursoru izolovaného z evropského tisu *Taxus baccata* (Miller & Ojima 2000, Fitzpatrick & Wheeler 2003).

Taxany patří do skupiny mitotických jedů vážící se k β podjednotce tubulinového dimeru. Touto vazbou taxany prosazují polymeraci mikrotubulů, inhibují mikrotubulární depolymerizaci a mění mikrotubulární dynamiku. Následkem těchto změn dochází k narušení mikrotubulární sítě vyžadované v mitose (Wang et al. 2000, Fields & Runowicz 2003, Crown et al. 2004, Diaz et al. 2004, Jordan & Wilson 2004).

Taxany jsou metabolizovány (hlavně oxidovány) v játrech a jejich metabolity jsou exkretovány do žluče. Enzymy zodpovědné za oxidaci taxanů patří do rodiny CYP (cytochrom p) (Dorr 1997, Vaishampayan et al. 1999). Hlavním lidským metabolit paclitaxelu je C6 α -hydroxypaclitaxel a minoritně zastoupený metabolit C3' hydroxypaclitaxel plus další deacetylované formy paclitaxelu (Walle et al. 1995, Desai et al. 1998). Docetaxel je pozměněn na hydroxydocetaxel a poté metabolizován na dva hydroxyoxazolidiony and oxazolidinon (Shou et al. 1998). Oxidace jak paclitaxelu tak, docetaxelu vede k tvorbě mnohem méně účinnějších látek než jsou oba původní taxany.

Významným problémem při léčbě nádorů je resistance na jednotlivá léčiva. Tento fenomén, nazývaný "Multidrug resistance" (MDR), je hlavně způsoben P-glykoproteinem (P-gp), jenž je exportní pumpa patřící do rodiny ABC transportérů. P-gp je zodpovědný za vypumpování léčiva z buňky, jehož následkem je snížená účinnost daného léčiva v léčbě nádoru (Malingre et al. 2001, Bodo et al. 2003). Slibným řešením k problému resistance může být syntesa nových derivátů taxanů, které sami o sobě jsou schopné inhibovat P-glykoprotein (Ferlini et al. 2000, Jordan et al. 2002, Ferlini et al. 2003a). Další příčinu resistance u nádorových buněk reprezentují tubuliny. Snížená exprese α -tubulinu vede k zvýšení citlivosti na léčbu paclitaxelem zatímco snížení celkové exprese β 1 tubulinu vyvolává zvýšenou resistenci buněk k paclitaxelu (Kyu-ho et al. 2000, Wang & Cabral 2005).



Obr. 4. Struktura paclitaxelu a docetaxelu.

II.3.2. Indukce apoptozy taxany

Ačkoliv schopnost taxanů (paclitaxel, docetaxel) poškodit dynamiku mikrotubulů je dobře zdokumentována, samotný molekulární mechanismus jakým taxany indukují apoptosu není stále přesně objasněn. Je zřejmé, že aplikace taxanů vede ke stabilizaci mikrotubulů v mitotickém vřeténku a následnému bloku buněk v G_2/M fázi buněčného cyklu. V případě uvolnění buněk z mitotického bloku bez prodělané citokinese, dojde ke vzniku tetraploidních G_1 buněk, u kterých nastane zvýšené štěpení PARP proteinu, které se používá jako indikátor apoptozy (Chen et al. 2003).

Proces indukce apoptozy může v závislosti na buněčném typu a jiných faktorech zapojit více signálních drah, nicméně některé změny jsou přítomny vždy. Například bylo prokázáno, že působení taxanů indukuje fosforylaci Bcl-2 (Haldar et al. 1997, Blagosklony & Fojo 1999, Brichese et al. 2002). Avšak proč k tomuto jevu dochází není zatím zcela objasněno. Některé studie ukazují na pouhé spojení s mitotickým blokem než s indukcí apoptozy (Scatena et al. 1998). Jiné práce uvádí spojitost s apoptosou přes ztrátu fosforylovaného Bcl-2 vyvazovat proapoptotický Bax (Haldar et al. 1995, Srivastava et al. 1998). Navíc, kromě samotné fosforylace Bcl-2, je aplikace taxanů také spojena se sníženou expresí Bcl-2 (Ferlini et al. 2003b). K resistenci buněk k účinkům taxanů přispívá i survivin, u kterého dochází krátce po aplikaci taxanů k zesílené expresi. Survivin působí jednak v cytoplasmě jako buněčný inhibitor kaspas a jednak v jádře se nacházejícím komplexu proteinů kontrolního bodu mitotického vřeténka, který blokuje únik buňky z G_2/M bloku a následnou apoptosu. (Ling et al. 2004, Bergstrahl & Ting 2006, Pratt et al. 2006).

Indukce apoptosy taxany je pravděpodobně nezávislá na proteinu p53. Avšak zdá se být jisté, že se zde uplatňuje mitochondriální dráha, včetně uvolnění cytochromu c a aktivace kaspasy 3 a 9 (Moos and Fitzpatrick 1998, Gangemi et al. 2000, Abal et al. 2003, Ganansia-Leymarie et al. 2003, Ehrlichova et al. 2005). Pro účast mitochondriální dráhy napovídá i regulace kaspasy 9 komplexem CDK1/cyclin B1. Fosforylovaná kaspasa 9 není schopná aktivace, ale jak ubývá cyclin B1, klesá negativní fosforylace kaspasy 9 a naopak roste procento buněk indukujících apoptosu po aplikaci mitotických jedů (Allan & Clarke, 2007). Nicméně to zřejmě není jediný mechanismus indukce apoptosy paclitaxelem, neboť u některých buněčných linií je buněčná smrt nezávislá na kaspase 3 a kaspase 9 (Ofir et al. 2002).

Relativně nedávno byla popsána aktivace kaspasy 8 a kaspasy 10, jenž se aktivují v komplexu DISC na intracelulární straně receptorů smrti. Aplikace taxanů kromě samotné aktivace kaspasy 8 a kaspasy 10 snižovala expresi inhibitoru cFLIP, působícího právě na tyto kaspasy (Park et al. 2004, Day et al. 2006).

Indukce apoptosy taxany v sobě zahrnuje charakteristické změny v genové expresi a aktivaci MAPKs (mitogen activated kinase), Raf-1, PTK (protein tyrosine kinases), JNK (c-Jun NH(2)-terminal kinase) a cyclin-dependent kinases (Stone & Chambers 2000, Wang et al. 2000, Boudny & Nakano 2003, Broker et al. 2004, Gruber et al. 2004, Mabuchi et al. 2004, Stumm et al. 2004).

II.3.3. Klinické využití indukce apoptosy taxany

Paclitaxel (Taxol[®]) a docetaxel (Taxotere[®]) patří mezi jedny z nejvíce používaných chemoterapeutik v léčbě rakoviny prsu, vaječníku, plic, prostaty a s částečnou úspěšností v léčbě rakoviny krku, jícnu a hlavy. I přes skutečnost možného způsobení jistých vedlejších efektů jako jsou neutropenie, žaludeční nevolnost, střevní zánět, se taxany staly široce používané chemoterapeutikum. Kromě samostatné aplikace taxanů se můžeme v poslední době setkat s léčbou kombinovanou s chemoterapeutiky jako jsou sloučeniny platiny, antracykliny, analogy nukleotidů nebo v kombinaci s ozařováním nádorů. Ukazuje se, že tyto kombinované terapie mají lepší účinek než samotný paclitaxel a docetaxel (Ragazzi et al. 2002, Guastalla & Dieras 2003, Li et al. 2004, Onda et al. 2004, Sit et al.

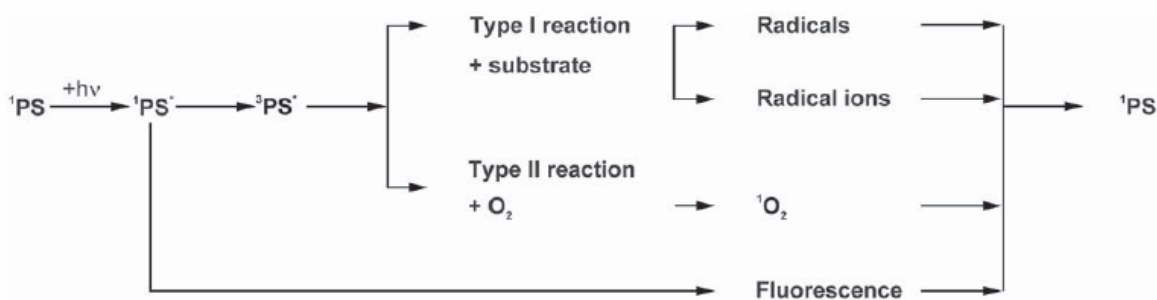
2004, Allal et al. 2006, , Hurley et al. 2006, Chakravarthy et al. 2006, Chu et al. 2006, Belani et al. 2007).

Další varianta zvyšující účinnost léčby taxany je syntesa nových analogů taxanů. Ukazuje se, že tyto nové analogy taxanů mají větší účinnost v překonání resistance nádorů způsobené hlavně zesílenou expresí ABC transportérů (Ferlini et al. 2000, Jordan et al. 2002, Ferlini et al. 2003a, Geney et al. 2005, Kuznetsova et al. 2006, naše nepublikované data).

II.4. Porfyriny a apoptosa

II.4.1. PDT a porfyriny

Fotodynamická terapie (PDT – photodynamic therapy) je speciální forma terapie, která přitahuje zájem jako nový přístup k léčbě nádorových onemocnění. Tato metoda využívá fotosensitivní látky (PS – photosensitizer), přednostně se akumulující v nádorové tkáni, a lokální ozáření světlem generovaným leaserem k vyvolání reakce v buňce. Aktivace fotosensitivní látky po absorpci světelné energie převádí tuto látku ze základního stavu ^1PS do excitovaného siglového stavu $^1\text{PS}^*$. Z tohoto excitovaného stavu se PS^* může vrátit zpět do základního stavu vyzářením fluorescence, jenž se dá využít pro fotodetekci. Pro PDT terapii je však podstatné, že PS podstoupí konverzi elektronového spinu na jeho tripletový stav $^3\text{SP}^*$. Takto excitovaný $^3\text{SP}^*$ v přítomnosti kyslíku může přímo reagovat se substrátem a vytvářet radikály a radikálové ionty, které nakonec reagují s kyslíkem za tvorby ROS (reakce typu I). Druhou možností je přenos energie přímo na kyslík za vzniku singletového kyslíku $^1\text{O}_2$ (reakce typu II), jenž představuje nejvíce poškozující ROS produkovaný PDT (Obr. 5.) (Castano et al. 2004, Triesscheijn et al. 2006).



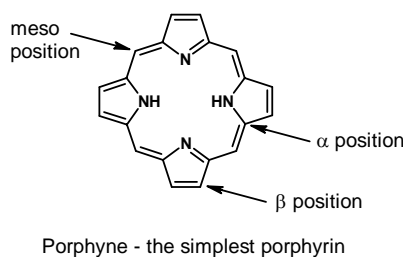
Obr. 5. Princip fotodynamické terapie.

(Podle Triesscheijn et al. 2006)

PDT terapie závisí zejména na fotosensitivní látce. Ideální fotosensitivní látka by měla splňovat několik zásad. Základem je minimální toxicita dané látky před ozářením a zároveň by nemělo docházet ani k alergické reakci po aplikaci do těla. PS se musí preferenčně akumulovat v nádorových tkáních. Rovněž je výhodné, aby PS absorbovala světlo v rozmezí vlnových délek 600 – 800 nm. Důvodem je lepší prostupnost tkáněmi a

omezení fotosensitivní kůže. Omezení 800 nm je dáno již neúčinným přenosem energie z tripletového stavu na singletový kyslík (Castano et al. 2004).

Fotosensitivní látky můžeme rozdělit do 3 rodin podle odvození jejich struktury od (1) porfyriu, (2) chlorofylu a (3) barviva s fotodynamickým účinkem. Nejvíce zastoupenou skupinou fotosensitivních látek používaných v PDT metodě jsou deriváty porfyriu, které jsou uměle syntetizovány. Porfyriuový kruh je však sám o sobě hydrofóbní, což vede k tvorbě agregátů v tělních tekutinách a tkáních. Následkem toho klesá optimální biologická lokalizace a fotodynamická aktivita. Pro zlepšení vlastností je základní struktura porfyriu v pozici meso substituována různými skupinami, jimiž se od sebe jednotlivé deriváty odlišují (Obr. 6.) (Oleinick et al. 2002, Castano et al. 2004).



Obr. 6. Jednoduchý porfyriuový makrocycklus.

II.4.2. Molekulární mechanismus indukce buněčné smrti porfyriu

Jak již bylo zmíněno interakce fotosensitivní látky se světlem vede za přítomnosti kyslíku k tvorbě ROS. PDT produkující ROS likviduje nádory několika mechanismy. PDT působí (1) přímo na nádorové buňky, (2) poškozuje vaskularizaci nádoru a tím přerušuje jeho zásobení živinami a kyslíkem, (3) působí na imunitní systém (Korbelik 1996, Krammer 2001, Dolmans et al. 2002, Oleinick et al. 2002, Duijnhoven et al. 2003, Castano et al. 2006).

Molekulární mechanismus a typ buněčné smrti závisí na řadě faktorů. Jedná se zejména o dávku PS, intenzitu záření, lokalizaci fotosensitivní látky v buňce a buněčný typ. Obecně platí, že se vzrůstající koncentrací fotosensitivní látky a délkou osvětlení i roste procento buněk umírajících nekrosou. Stejně tak lokalizace fotosensitivní látky v cytoplasmatické membráně může způsobit odlišný typ buněčné smrti než lokalizace v mitochondriích (Oleinick et al. 2002, Almeida et al. 2004).

Vzhledem k variabilitě jednotlivých porfyrinů a jejich odlišnou lokalizací v buňce je zřejmé, že mechanismus indukce apoptosy bude zahrnovat více než jednu signální dráhu, ačkoliv počátečním impulsem všech porfyrinů je tvorba ROS. V mechanismu indukce apoptosy porfyriny se mohou uplatňovat obě hlavní apoptotické dráhy, (1) dráha receptorů smrti a (2) mitochondriální dráha.

Některé porfyriny mohou indukovat přechodně zvýšenou expresi jak FasR tak FasL, což vede k multimerizaci FasR a následné interakci s adaptorovým FADD proteinem a posléze aktivaci kaspasy 8. *In vivo* studie rovněž prokázaly indukci apoptosy u nádorových buněk s povrchovou expresí FasR. Naopak použití protilátek proti FasR vedlo k poklesu apoptosy. Kromě indukce multimerizace FasR po navázání FasL byli detekovány i systémy kde samotné použití porfyrinu vedlo k přímé multimerizaci FasR bez účasti FasL (Ahmad et al. 2000, Yokota et al. 2000, Ali et al. 2002, Tan & Hunziker 2003, Zhuang & Kochevar 2003).

Studie sledující lokalizaci jednotlivých derivátů porfyrinů ukázaly, že jejich lokalizace je dána výsledným nábojem. Deriváty porfyrinů se záporným nábojem se přednostně lokalizují v lysosomech a indukují apoptosu porušením lysosomů a následném zapojení mitochondriální dráhy zatímco deriváty porfyrinů s výsledným kladným nábojem se přednostně lokalizují do mitochondrií odkud přímo a rychleji indukují apoptosu (Woodburn et al. 1991, Nagata et al. 2003).

Důležitým faktorem v PDT je zvolení správného intervalu mezi podáním PS a následným ozářením. Pokud totiž není PS plně lokalizována v nádoru, působí daná PS i na buňky endotelia. Například klinicky používaný Photofrin způsobuje zúžení cév, propustnost pro velké makromolekuly, leukocytární adhezi a tvorbu trombů. Zúžení cév může být spojeno s inhibicí a uvolňováním NO. To vše může přispívat k poškození endotelia cév zásobujících nádor (Fingar et al 1993, Gilissen et al. 1993).

Dalším faktorem, který je zapojen v mechanismu destrukce nádoru použitím PDT terapie je i samotný imunitní systém. Ukazují na to zejména studie s transplantací nádorů do imunosupresivních a imunokompetentních myši. Imunokompetentní myši léčené PDT terapií vykazovaly resistenci k opětovné transplantaci nádoru, zatímco myši, u nichž byl před opakovanou transplantací nádoru poškozen imunitní systém, nebo myši jenž byly poprvé vyléčeny chirurgickým zákrokem, neprokázaly žádnou resistenci k tomuto nádoru. Účast imunitního systému podporuje i fakt, že přenos buněk imunitního systému z myši léčené PDT terapií do myši s poškozeným imunitním systémem vedl k léčbě daného

nádoru (Canti et al. 1994, Korbelik et al. 1996, Hendrzak-Henion et al. 1999, Korbelik & Dougherty 1999).

Kromě dlouhodobé protinádorové léčby může PDT generovat zánětlivou odpověď. PS lokalizované v plasmatických nebo organelových membránách vedou k aktivaci fosfolipas a degradaci fosfolipidů spojenou s mohutným uvolňováním zánětlivých mediátorů (Castano et al. 2005b, Castano et al. 2006).

II.4.3. Klinické využití fotodynamické terapie

Fotodynamická terapie nachází stále větší uplatnění v léčbě nádorových onemocnění (nádory mozku, krku, hlavy, plic, jícnu, žaludku). Jako první byl pro klinické použití schválen Photofrin[®], derivát hematoporfyrinu. V současnosti je již několik schválených PS pro použití v klinické praxi (Foscan[®], Visudyne[®], Levulan[®], Metvix[®]) a nadále pokračuje vývoj třetí generace PS, jenž by měli splňovat charakteristiky uvedené výše (Brown et al. 2004, Huang 2005, Triesscheijn et al. 2006)

Pro zvýšení účinnosti PDT terapie můžeme použít kombinaci s hypertermií. Hypertermie poškozuje tkáň přímo i nepřímo uvnitř nádoru narozdíl od PDT, kde se fotodynamický účinek může snížit vlivem nedostatečného množství kyslíku. Hypertermie působí selektivně na hypoxické buňky, protože tyto buňky s redukováným pH jsou velmi citlivé na hypertermní působení z důvodů nedostatku výživy zajišťované krví (Frank et al. 2003, Lukšiene 2003, Chekulayeva et al. 2004, Yanase et al. 2005, Yanase et al. 2006). Kromě protinádorové léčby se PDT ukazuje jako vhodný prostředek proti lokálním bakteriálním infekcím. Některé PS jsou schopné inkorporovat se do buněčných stěn a zvýšit tak propustnost pro další molekuly PS působící na plasmatické membrány bakterií a kvasinek. Navíc pro usmrcení patogenů stačí mnohem jemnější podmínky, které zajišťují vysoký stupeň selektivity k hostitelské tkáni. Potenciálními cíly protibakteriální PDT jsou zejména atopické dermatitidy, acne vulgaris, některé infekce dutiny ústní a infikované rány (Demidova & Hamblin 2004, Maisch et al. 2004, Lambrechts et al. 2005, Maisch et al. 2005, Jori 2006).

III. Komentář k prezentovaným publikacím

III.1. Indukce apoptosy deprivací železa

Pro studium mechanismu indukce apoptosy deprivací železa jsme zavedli nový způsob navození deprivace železa. V naší laboratoři jsme připravili chemicky definovaná bezsérová média, kde jako jediný zdroj železa byl saturovaný transferin nebo citrát železitý. Pro navození deprivace železa jsme pouze odebrali zdroj železa (transferin nebo citrát železitý) z kultivačního média. Tento systém poskytuje přímé důsledky deprivace železa vedoucí k indukci apoptosy, narozdíl od chelátorů železa (Kovář et al. 1997a). Chelátory železa sice váží železo s větší afinitou než ostatní kovy, avšak jsou schopné též vyvazovat jiné bioaktivní kovy jako zinek a měď. Použití chelátorů železa tak může vést ke skresleným údajům týkající se mechanismu indukce apoptosy deprivací železa. Proto se domníváme, že námi používaný systém poskytuje relevantnější data.

Abychom odlišili změny spojené pouze s indukcí apoptosy deprivací železa od změn vyvolaných pouze samotnou deprivací železa, používáme srovnání buněčné linie sensitivní a resistantní k indukci apoptosy deprivací železa.

První studie odhaluje vzestupně jednotlivé klíčové kroky mechanismu indukce apoptosy deprivací železa u myšších nádorových buněk. Popsaná signální dráha zahrnuje translokaci proapoptotického proteinu Bax na mitochondrie až po závěrečnou aktivaci exekuční kaspasy 3 (Koc et al. 2005).

Druhá studie se týká změny sensitivity lidských nádorových buněk k indukci apoptosy deprivací železa v závislosti na adaptaci buněk k různému zdroji dostupného železa, tzn. deprivace železa vyvolala odlišnou odpověď u buněk adaptovaných na citrát železitý jako jediný zdroj železa ve srovnání se stejnými buňkami adaptovanými k transferinovému železu (Koc et al. 2006)

III.1.1. Indukce apoptozy deprivací železa zahrnuje translokaci Bax proteinu a následnou aktivaci mitochondriální dráhy

Koc M., Nadřová Z., Truksa J., Ehrlichová M., Kovář J.: Iron deprivation induces apoptosis via mitochondrial changes related to Bax translocation. *Apoptosis*, **10**(2): 381-93, 2005.

Z předchozí práce jsme věděli, že mechanismus indukce apoptozy deprivací železa není závislý na aktivaci proteinu p53 a dále ani na změně exprese regulačních proteinů Bax a Bcl-2 (Truksa et al. 2003). Jelikož jsme neidentifikovali žádné změny na úrovni exprese u proteinů účastnících se regulace apoptozy, rozhodli jsme se otestovat signální dráhu vzestupně a to od exekučních kaspas, účastnících se exekuce apoptozy.

Ve studii byli použity citlivní (38C13) a rezistentní (EL4) myší buněčné linie k indukci apoptozy deprivací železa. Obě buněčné linie jsou hematopoietického původu, kde citlivní buněčná linie 38C13 je B lymfom a rezistentní buněčná linie EL4 je T lymfom. V prvním kroku jsme otestovali hlavní exekuční kaspasu 3. Prokázali jsme účast aktivované kaspasy 3 v důsledku indukce apoptozy deprivací železa u citlivních 38C13 buněk.

V dalším kroku jsme sledovali kaspasu 9, která je jedna z potenciálních proteas aktivující kaspasu 3. I zde jsme prokázali aktivní účast iniciační kaspasy 9 u citlivních 38C13 buněk v indukci apoptozy deprivací železa. U rezistentních EL4 buněk jsme nezaznamenali žádnou aktivaci kaspasy 9 v důsledku deprivace železa. Z publikovaných výsledků je známo, že k aktivaci kaspasy 9 vede vylití cytochromu c z mitochondrií.

Pomocí konfokální mikroskopie a buněčné frakcionace jsme skutečně detekovali uvolnění cytochromu c do cytosolu u citlivních 38C13 buněk v důsledku indukce apoptozy deprivací železa. Navíc, uvolnění cytochromu c bylo spojeno s poklesem mitochondriálního membránového potenciálu. Rezistentní EL4 buňky nevykazovali žádnou z výše uvedených změn.

Dále nás zajímalo zda je porucha integrity mitochondrií spojena s proapoptotickými proteiny Bcl-2 rodiny, konkrétně jsme sledovali protein Bax. Výsledky z konfokálního mikroskopu jednoznačně ukázaly translokaci Bax proteinu na mitochondrie u citlivních 38C13 buněk. Výsledek byl také potvrzen pomocí western blotu s detekovaným Bax proteinem v mitochondriální frakci.

Závěrem můžeme shrnout, že klíčovým krokem indukce apoptosy deprivací železa je translokace proapoptotického proteinu Bax z cytosolu na mitochondrie. Permeabilizace mitochondrií způsobená translokací proteinu Bax následně vyvolává kolaps mitochondriálního membránového potenciálu a vylití cytochromu c do cytosolu. Cytochrom c společně s Apaf-1 proteinem a prokaspasou 9 vytvoří komplex apoptosom, který umožní aktivaci iniciační kaspasy 9. Exekuční kaspasa 3 je následně aktivována kaspasou 9.

Nezodpovězenou otázkou však zůstává způsob aktivace proteinu Bax, jenž tento protein směřuje na mitochondrie a společně s tím i mechanismus, jakým protein Bax působí na mitochondriích. Zda se jedná o přímou tvorbu kanálu složených z Bax proteinů nebo zda dochází pouze k interakci s VDAC (voltage dependent anion channel) a jeho následnému otevření.

III.1.2. Sensitivita buněk k indukci apoptosy deprivací železa se reversibilně mění v závislosti na dostupnosti železa

Koc M., Naďová Z., Kovář J.: Sensitivity of cells to apoptosis induced by iron deprivation can be reversibly changed by iron availability. *Cell Prolif.*, **39**(6): 551-61, 2006.

Podobně jako u první studie jsme se pokusili přispět k objasnění mechanismu indukce apoptosy deprivací železa u lidských nádorových buněk, konkrétně jsme použili sensitivní Raji a resistantní Jurkat buňky. Stejně jako v myším modelu tak i u lidského modelu byla sensitivní linie B lymfom a resistantní T lymfom. U obou studovaných modelů byl prokázán mechanismus nezávislý na proteinu p53 a očekávali jsme podobně jako u myšího modelu účast mitochondriální signální dráhy i u lidského modelu. Avšak výsledky naznačují, že mechanismus indukce apoptosy deprivací železa u lidských buněk nezahrnuje účast mitochondrií (nepublikovaná data).

Z důvodu odlišných výsledků mezi lidským a myším modelem bylo v našem zájmu získat Raji klon resistantní k indukci apoptosy deprivací železa pro porovnání stejné buněčné linie. Abychom získali resistantní Raji klon, rozhodli jsme se postupně snižovat koncentraci železa v kultivačním bezsérovém médiu. Pro lepší manipulaci s koncentracemi jsme nahradili saturovaný transferin ekvivalentním množstvím citrátu železitého v počáteční koncentraci 500 μ M. Po výměně transferinu v médiu ekvivalentním

množstvím citrátu železitého došlo k zpomalení buněčné proliferace Raji buněk, způsobené pravděpodobně adaptací na odlišný zdroj železa. Po každých 8 pasážích jsme Raji buňkám snížili koncentraci citrátu železitého v médiu na 200, 100 a konečných 50 μ M. Tyto buňky kultivované v definovaném médiu s 50 μ M citrátem železitým byly označeny Raji/lowFe.

Raji a Raji/lowFe buňky byly posléze vystaveny deprivaci železa na 96h. Během 48h došlo u 30-50% Raji buněk k indukci buněčné smrti a po 96h byla již indukce buněčné smrti 100%. Avšak Raji/lowFe buňky během 96h deprivace železa nevykazovaly žádné známky buněčné smrti, ale naopak byly schopné dál proliferovat. Nyní jsme získali resistantní klon k indukci apoptosy deprivací železa.

Poté co jsme zjistili, že Raji/lowFe jsou resistantní k indukci apoptosy deprivací železa, jsme readaptovali tyto buňky na médium s transferinem. Tyto buňky jsme opět vystavili deprivaci železa po dobu 96h. Následkem readaptace na transferinové médium se tyto buňky staly sensitivní k indukci apoptosy deprivací železa, což ukazuje na skutečnost, že změna sensitivity k indukci apoptosy deprivací železa nebyla u těchto Raji buněk způsobena žádnou genetickou změnou. Buňky readaptované na médium s transferinem jsme označili Raji/lowFe-re.

Dále jsme prokázali, že indukce apoptosy deprivací železa vede k aktivaci exekuční kaspasy 3 pouze u sensitivních Raji buněk a ne u resistantních Raji/lowFe buněk. Zbylé exekuční kaspasy 7 a 6 nejsou v mechanismu indukce apoptosy deprivací železa zúčastněny.

Zmíněné výsledky ukazují, že sensitivita k určitému stimulu buněčné smrti závisí na konkrétním metabolickém stavu buňky. Navíc Raji/lowFe buňky mohou posloužit pro objasnění vztahu metabolismu železa k buněčné smrti.

III.2. Transport železa

Intracelulární hladina železa závisí na jeho transportu přes plasmatickou membránu. Hlavním zdrojem železa pro buňku je receptorem zprostředkovaná endocytosa transferinového receptoru s navázaným ligandem. Nicméně neméně důležitým zdrojem je příjem nízkomolekulárního železa z citrátu železitého, obzvláště pokud víme, že změna dostupnosti zdroje železa může změnit sensitivitu buněk např. k indukci buněčné smrti při nádorové terapii deprivací železa. Proto pro navození deprivace železa je důležité zabránit buňce v přístupu k železu a k tomu je nutné zjistit transportní systémy účastnící se transportu nízkomolekulárního železa.

III.2.1. HSP90 je membránový železo vázající protein

Kovář J., Štýbrová H., Novák P., Ehrlichová M., Truksa J., **Koc M.**, Kriegerbecková K., Scheiber-Mojdehkar B., Goldenberg H.: Heat shock protein 90 recognized as an iron-binding protein associated with the plasma membrane of HeLa cells. *Cell. Physiol. Biochem.*, **14**: 41-46, 2004.

V této studii jsme hledali železo vázající membránové proteiny, které by tak mohli být potenciálními transportéry železa nebo součástí transportérového komplexu nízkomolekulárního železa.

Pro detekci proteinů schopných vázat nízkomolekulární železo byla použita metoda popsaná v práci Chen a Drysdale (1993). Ve stručnosti, izolované membránové proteiny byli extrahovány 1.5% tritonem X-100 a rozděleny SDS-PAGE elektroforezou. Proteiny byli dále přeneseny na nitrocelulosovou membránu a renaturováni v HEPES/Tris pufru. Membránu s proteiny jsme poté inkubovali ve stejném pufru společně s radioaktivně značeným ^{55}Fe v 1 μM citrátu železitém.

Inkubace membrány s radioaktivně značeným železem v citrátu železitém detekovala několik proteinů vázající železo. Tyto proteiny byli vyříznuty z gelu a identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrické techniky.

Jedním z identifikovaných proteinů vázající železo byl protein HSP90 (heat shock protein 90). Purifikovaný HSP90 jsme opět přenesli na membránu společně s apo-transferinem (pozitivní kontrola) a albuminem (negativní kontrola). Výsledkem byla

opětovná vazba radioaktivně značeného železa na HSP90, apotransferin a žádná vazba na albumin.

Pro ověření polohy proteinu HSP90 jsme použili metodu konfokální mikroskopie a nepřímé značení fixovaných a nefixovaných buněk. Z konfokální mikroskopie byla zřejmá jednak asociace HSP90 s plasmatickou membránou tak i umístění v cytosolu. FACS analýza posléze odhalila detekci HSP90 pouze u fixovaných buněk a ne již u nativně značených buněk. Výsledná data tedy ukazují na membránovou lokalizaci, avšak pouze na intracelulární straně membrány.

Získané výsledky prezentují protein HSP90 jako železo vázající protein a jeho membránová pozice může být spojena s transportním systémem. Nicméně otázka zda HSP90 je schopný zajišťovat transport nízkomolekulárního železa sám a nebo s nějakým membránovým komplexem, zůstává neznámá.

III.3. Taxany a indukce apoptosy

Paclitaxel a Docetaxel jsou látky stabilizující mikrotubuly v mitotickém vřetenku v G₂/M fázi a mohou tak indukovat buněčnou smrt. Pro tuto vlastnost jsou využívány v léčbě řady nádorů (nádory prsu, vaječníků, plic a prostaty). Navíc, v kombinaci s jinými chemoterapeutiky (cisplatina, antracykliny) nebo v kombinaci se zářením zvyšují účinnost léčby (Zhao et al. 2005). Avšak, resistance nádorů v terapii taxany zůstává stále významným problémem a překonání této resistance je klíčem k úspěšné léčbě nádorů.

III.3.1. Indukce buněčné smrti taxany vede k uvolnění cytochromu c z mitochondrií u resistantních, ale ne u sensitivních buněk

Ehrlichová M., **Koc M.**, Truksa J., Naďová Z., Václavíková R., Kovář J.: Cell death induced by taxanes in breast cancer cells: cytochrome C is released in resistant but not in sensitive cells. *Anticancer Res.*, **25(6B): 4215-24, 2005.**

Tato práce je součástí většího projektu, který má za cíl popsat mechanismy resistance buněk nádoru prsu k indukci buněčné smrti klinicky používanými taxany paclitaxel a docetaxel na různých úrovních (transport, metabolismus, mechanismy indukce buněčné smrti). V této publikaci jsme se snažili přispět k lepšímu porozumění mechanismu týkajícího se indukce buněčné smrti taxany v buňkách nádorů prsu.

Náš experimentální model tvořily dvě buněčné linie vybrané na základě předběžných testů sensitivity několika buněčných linií nádoru prsu k indukci buněčné smrti taxany. Pro srovnávací studie jsme vybrali buňky MDA-MB-435 sensitivní k taxanům a buňky NCI-ADR-RES resistantní k taxanům. Na základě účinku jednotlivých koncentrací taxanů jsme určili účinné koncentrace pro jednotlivé buňky, přičemž nejmenší plně účinná koncentrace u obou taxanů byla 300krát větší u NCI-ADR-RES než u MDA-MB-435 buněk.

Prokázali jsme, že aplikace taxanů způsobuje blokaci buněčného cyklu v G₂/M fázi. Dále použité taxany za daných podmínek neindukovali apoptosu mechanismem závislým na aktivaci proteinu p53 .

Při analýze DNA v buňce průtokovou cytometrií jsme zaznamenali akumulaci částic s hypodiploidním obsahem DNA u účinných koncentrací, které indukují buněčnou

smrt. Nicméně tato hypodiploidní DNA nepředstavovala oligonukleosomální fragmentaci DNA, ale pouze náhodně tvořené fragmenty DNA, jak dokazuje experiment s DNA žebříčkem.

Dále jsme prokázali, že aplikace účinné koncentrace taxanu vedou k aktivaci exekeční kaspasy 3 u sensitivních (MDA-MB-435) i resistantních (NCI-ADR-RES) buněk. Stejného výsledku jsme dosáhli i u kaspasy 9, k jejíž aktivaci je potřebný cytochrom c. Avšak uvolnění cytochromu c z mitochondrií nastalo pouze u resistantních (NCI-ADR-RES) buněk a to při účinných koncentracích obou použitých taxanů.

Získané výsledky ukázaly na dvě věci. (1) mechanismus indukce buněčné smrti taxany je u sensitivních buněk odlišný od resistantních buněk i přesto, že byly použity stejné taxany na buňkách stejného tkáňového původu. (2) kaspasa 9 není u sensitivních buněk aktivována komplexem s cytochromem c, ale pravděpodobně je aktivována kaspasou 3.

III.4. Porfyriny a indukce apoptosy

Fotodynamická terapie představuje slibnou metodu léčby nádorových onemocnění a v současnosti prochází dalším experimentálním vývojem. Největší důraz pro zdokonalení PDT je kladen na vývoj ideální fotosensitivní látky. Nejslibnější se zde ukázaly sloučeniny založené na bázi porfyriu. Avšak samotný porfyriinový makrocyklus je zatížen nežádoucími vlastnostmi (malá rozpustnost, fotodynamická aktivita a tvorba agregátů v tělních tekutinách), které se u nových derivátů snažíme omezit nebo ještě lépe úplně odstranit.

III.4.1. Nové deriváty porfyriinů a indukce apoptosy

Králová J, Synytsya A, Poučková P, Koc M, Dvořák M, Král V.: Novel porphyrin conjugates with a potent photodynamic antitumor effect: differential efficacy of mono- and bis-beta-cyclodextrin derivatives in vitro and in vivo. *Photochem Photobiol.* **82**(2): 432-8, 2006.

V naší studii jsme použili dva nové porfyriinové deriváty P(β -CD)1, P(β -CD)2 a pro srovnání komerčně používaný Photofrin®. Nově syntetizované deriváty mají k porfyriinovému makrocyklu navázané fluorované fenylové skupiny a jeden (P(β -CD)1) nebo dva (P(β -CD)2) cyklodextrinové kruhy. Předpokládáme, že naše amfifilní deriváty P(β -CD)1, P(β -CD)2 jsou buňkou endocytovány ve formě agregátu a uvnitř buňky monomerizovány jak bylo u těchto amfifilních sloučenin prezentováno (Kelbauskas & Dietel 2002).

Námi sledované deriváty byly testovány v účinnosti indukce buněčné smrti u třech odlišných nádorových linií *in vitro* a jednoho nádoru *in vivo*. Výsledky *in vitro* ukazují na lepší účinek P(β -CD)1. Jednak vlastní příjem buňkou je u P(β -CD)1 několikanásobně větší a dále koncentrace a světelná dávka potřebná pro indukci buněčné smrti u 50% buněk je poloviční ve srovnání s P(β -CD)2 a Photofrinem®. Stejně tak kinetika účinku je u P(β -CD)1 rychlejší.

Avšak při srovnání účinnosti obou porfyriinových derivátů v *in vivo* studii jsme získali odlišné výsledky. Při aplikaci P(β -CD)2 jsme zaznamenali nejvyšší koncentrace

v nádoru již po 6 h, aniž by docházelo k nežádoucí kumulaci P(β -CD)2 v kůži. Navíc třetí den po ozáření došlo k úplné regresi nádoru.

Při aplikaci P(β -CD)1 jsme zaznamenali nejvyšší koncentraci v nádoru kolem 48h, nicméně s rostoucí koncentrací P(β -CD)1 v nádoru docházelo i k nežádoucímu navýšení koncentrace P(β -CD)1 v kůži. Aplikace P(β -CD)1 opět vedla k maximální redukci nádoru kolem třetího dne po ozáření jako u P(β -CD)2, avšak posléze došlo k opětovnému nárůstu nádoru. Podobného výsledku jako u P(β -CD)1 jsme dosáhli i aplikací Photofrinu®, kdy redukce nádoru byla pouze dočasná.

Důvod pro odlišné působení obou testovaných látek (P(β -CD)1 a P(β -CD)2) může být pravděpodobně ovlivněn biologickou dostupností *in vivo*. Obě fotosensitivní molekuly se váží s jinou proteinovou frakcí krevní plasmy. Vzniklé komplexy mohou ovlivnit rychlost transportu po těle a rychlost akumulace v nádoru.

Závěrem je zřejmé, že P(β -CD)2 derivát díky svým fotosensitivním vlastnostem rychlé distribuce v nádorové tkáni, rychlému vyloučení z těla a nízké systémové toxicitě je vhodný pro *in vivo* PDT aplikace, kde za vhodných podmínek může způsobit úplnou ablací nádoru.

IV. Presentované publikace

Koc M., Naďová Z., Truksa J., Ehrlichová M., Kovář J.: Iron deprivation induces apoptosis via mitochondrial changes related to Bax translocation. *Apoptosis*, **10**(2):381-93, 2005.

Koc M., Nadova Z., Kovar J.: Sensitivity of cells to apoptosis induced by iron deprivation can be reversibly changed by iron availability. *Cell Prolif.* **39**: 551–561, 2006.

Kovář J., Štýbrová H., Novák P., Ehrlichová M., Truksa J., **Koc M.**, Kriegerbecková K., Scheiber-Mojdehkar B., Goldenberg H.: Heat shock protein 90 recognized as an iron-binding protein associated with the plasma membrane of HeLa cells. *Cell. Physiol. Biochem.*, **14**: 41-46, 2004

Ehrlichová M., **Koc M.**, Truksa J., Naďová Z.: Cell death induced by taxanes in breast cancer cells: cytochrome C is released in resistant but not in sensitive cells. *Anticancer Res.*, **25(6B):4215-24**, 2005

Králová J, Snytsya A, Poučková P, **Koc M**, Dvořák M, Král V.: Novel porphyrin conjugates with a potent photodynamic antitumor effect: differential efficacy of mono- and bis-beta-cyclodextrin derivatives in vitro and in vivo. *Photochem Photobiol.* **82**(2):432-8, 2006.

V. Závěr

Tato práce se zaměřila na studium procesů uplatňujících se v indukci apoptosy různými faktory. V našem případě jsme indukovali buněčnou smrt u nádorových buněk deprivací železa, klinicky používanými taxany (paclitaxel, docetaxel) a nově syntetizovanými fotosensitivními látkami. Z presentovaných publikací jsme získali tyto závěry.

(1) Studie týkající se indukce apoptosy deprivací železa prokázaly účast odlišných signálních drah vedoucí k indukci apoptosy u myších a lidských nádorových buněk. V obou případech byla použita B lymfomová buněčná linie citlivá k deprivaci železa.

U myších buněk jsme popsali významnou část apoptotické signální dráhy u 38C13 buněk sensitivních k indukci apoptosy deprivací železa. Deprivace železa u těchto buněk vede k translokaci proapoptotického proteinu Bax z cytosolu na mitochondrie, která je následována zhroucením mitochondriálního membránového potenciálu v důsledku porušení integrity vnější mitochondriální membrány, uvolněním cytochromu c z mitochondrií, aktivací kaspasy 9 a následnou aktivací kaspasy 3.

U lidských buněk jsme taktéž zaznamenali indukci apoptosy deprivací železa, avšak charakterem mechanismu odlišnou od apoptosy popsané u myších 38C13 buněk. V případě lidských Raji buněk sensitivních k indukci apoptosy deprivací železa docházelo pouze k aktivaci kaspasy 3, nikoliv však k aktivaci kaspasy 9 a mitochondriálním změnám. Způsob aktivace kaspasy 3 v tomto případě zůstává neznámý.

Významného zjištění jsme dosáhli vytvořením resistantního klonu Raji buněk k indukci apoptosy deprivací železa. Během přípravy resistantního klonu byly Raji buňky adaptovány na nižší koncentraci železa v médiu za pomoci nízkomolekulárního citrátu železitého. Výsledný klon Raji buněk adaptovaný na nízkomolekulární zdroj železa vykazoval resistenci k indukci apoptosy deprivací železa. Avšak, je-li tento klon readaptován na transferinové železo (optimální zdroj železa), dochází opět k obnovení sensitivity tohoto klonu k indukci apoptosy deprivací železa. Toto zjištění ukazuje, že sensitivity buněk k určitému stimulu buněčné smrti může záviset na konkrétním metabolickém stavu buněk.

(2) Studie zaměřené na potenciální transportéry nízkomolekulárního železa vedly k identifikaci HSP90 jako železo vázajícího proteinu. Prokázali jsme, že HSP90 je

asociován s plasmatickou membránou. Avšak otázka, je-li HSP90 nějakým způsobem uplatněn v transportu nízkomolekulárního železa, vyžaduje další studie.

(3) Studie týkající se indukce buněčné smrti taxany byla založena na srovnání sensitivní (MDA-MB-435) a resistantní (NCI-ADR-RES) buněčné linie. Pro indukci buněčné smrti jsme u resistantních buněk použili 300x větší koncentraci ve srovnání se sensitivní buněčnou linií.

U obou buněčných linií předcházela buněčné smrti akumulace buněk v G2/M fázi, jak je typické pro účinek taxanů na buněčný cyklus. Následná indukce apoptosy byla u obou těchto buněčných linií nezávislá na aktivaci proteinu p53. Dále, jak u MDA-MB-435 tak u NCI-ADR-RES buněk nedocházelo k oligonukleosomální fragmentaci DNA, ačkoliv byla detekována aktivní kaspasa 3. Obě testované linie aktivovaly po aplikaci účinné koncentrace paclitaxelu kaspasu 9, nicméně pouze u resistantní buněčné linie (NCI-ADR-RES) docházelo i k uvolňování cytochromu c z mitochondrií, vyžadovaného k aktivaci kaspasy 9. Dosažené výsledky ukazují na rozdílný mechanismus indukce buněčné smrti u obou linií a jeho poznání vyžaduje další studie.

(4) Ve studii zaměřené na PDT jsme zkoumali vlastnosti dvou nových derivátů porfyrinu P(β -CD)1 a P(β -CD)2 pro jejich použití ve fotodynamické terapii (PDT). Oba deriváty byly testovány na několika buněčných nádorových liniích a v BALB/c myších s transplantovaným syngením karcinomem 4T1. Jak P(β -CD)1, tak P(β -CD)2 byly po aplikaci lokalizovány v lysosomech, avšak celkový účinek na nádorové buňky se trochu odlišoval. V *in vitro* experimentech prokázal P(β -CD)1 takové lepší vlastnosti než P(β -CD)2 jako jsou nižší ozařovací dávka, nižší účinná koncentrace a rychlejší kinetika příjmu buňkou. V případě *in vivo* experimentech byl však za vhodných podmínek P(β -CD)2 schopný trvale odléčit transplantovaný nádor, navíc zde nedocházelo k nežádoucí kumulaci P(β -CD)2 v kůži. U P(β -CD)1 bohužel nedošlo k trvalému odléčení nádoru v žádné zvolené koncentraci a navíc u této látky docházelo poměrně rychle k nežádoucí akumulaci v kůži.

Proto se domíváme, že P(β -CD)2 derivát se díky svým fotosensitivním vlastnostem, rychlé distribuce v nádorové tkáni, rychlému vyloučení z těla a nízké systémové toxicitě ukázal jako vhodný prostředek pro *in vivo* PDT aplikace.

VI. Literatura

- Abal M., Andreu J.M., Barasoain I.: Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Curr. Cancer Drug. Targets* **3**(3): 193-203, 2003.
- Abeysinghe R.D., Greene B.T., Haynes R., Willingham M.C., Turner J., Planalp R.P., Brechbiel M.W., Torti F.M., Torti S.V.: p53-independent apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator. *Carcinogenesis* **22**(10): 1607-1614, 2001.
- Adams J.M., Cory S.: Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**(6): 715-720, 2002.
- Afshar G., Jelluma N., Yang X., Basila D., Arvold N.D., Karlsson A., Yount G.L., Dansen T.B., Koller E., Haas-Kogan D.A.: Radiation-induced caspase-8 mediates p53-independent apoptosis in glioma cells. *Cancer Res.* **66**(8): 4223-4232, 2006.
- Ahmad N., Gupta S., Feyes D.K., Mukhtar H.: Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J. Invest. Dermatol.* **115**(6): 1041-1046, 2000.
- Alboran I.M., Robles M.S., Bras A., Baena E., Martinez A.C.: Cell death during lymphocyte development and activation. *Semin. Immunol.* **15**(3): 125-133, 2003.
- Ali S.M., Chee S.K., Yuen G.Y., Olivo M.: Photodynamic therapy induced Fas-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.* **9**(3): 257-270, 2002.
- Allal A.S., Zwahlen D., Becker M., Dulguerov P., Mach N.: Phase I trial of concomitant hyperfractionated radiotherapy with docetaxel and cisplatin for locally advanced head and neck cancer. *Cancer J.* **12**(1): 63-68, 2006.
- Allan L.A., Clarke P.R.: Phosphorylation of Caspase-9 by CDK1/Cyclin B1 Protects Mitotic Cells against Apoptosis. *Mol. Cell* **26**: 301-310, 2007.
- Almeida R.D., Manadas B.J., Carvalho A.P., Duarte C.B.: Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1704**(2): 59-86, 2004.
- Andersen M.H., Becker J.C., Straten P.: Regulators of apoptosis: suitable targets for immune therapy of cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**(5): 399-409, 2005.
- Andrews N.C., Schmidt P.J.: Iron Homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.* **69**: 69-85, 2007.
- Baliga B.C., Read S.H., Kumar S.: The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death. Differ.* **11**(11): 1234-1241, 2004.
- Bao Q., Shi Y.: Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ.* **14**(1): 56-65, 2007.
- Basar I., Ayhan A., Bircan K., Ergen A., Tasar C.: Transferrin receptor activity as a marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br. J. Urol.* **67**(2): 165-168, 1991.
- Belani C.P., Dakhil S., Waterhouse D.M., Desch C.E., Rooney D.K., Clark R.H., Monberg M.J., Ye Z., Obasaju C.K.: Randomized phase II trial of gemcitabine plus weekly versus three-weekly paclitaxel in previously untreated advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **18**(1): 110-115, 2007.
- Bergstralh D.T., Ting J.P., Microtubule stabilizing agents: their molecular signaling consequences and the potential for enhancement by drug combination. *Cancer Treat. Rev.* **32**(3): 166-179, 2006.

- Bidere N., Lorenzo H.K., Carmona S., Laforge M., Harper F., Dumont C., Senik A.: Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**(33): 31401-31411, 2003.
- Blagosklonny M.V., Fojo T.: Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). *Int. J. Cancer* **83**(2): 151-156, 1999.
- Bodo A., Bakos E., Szeri F., Varadi A., Sarkadi B.: The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity. *Toxicol. Lett.* **140-141**: 133-143, 2003.
- Boudny V., Nakano S.: Src tyrosine kinase but not activated Ras augments sensitivity to taxanes through apoptosis in human adenocarcinoma cells. *Anticancer Res.* **23**(1A): 7-12, 2003.
- Boya P., Andreau K., Poncet D., Zamzami N., Perfettini J.L., Metivier D., Ojcius D.M., Jaattela M., Kroemer G.: Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J. Exp. Med.* **197**(10): 1323-1334, 2003.
- Brard L., Granai C.O., Swamy N.: Iron chelators deferoxamine and diethylenetriamine pentatetic acid induce apoptosis in ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **100**: 116-127, 2006.
- Bredesen D.E.: Key note lecture: toward a mechanistic taxonomy for cell death programs. *Stroke* **38**(2): 652-660, 2007.
- Brichese L., Barboule N., Heliez C., Valette A.: Bcl-2 phosphorylation and proteasome-dependent degradation induced by paclitaxel treatment: consequences on sensitivity of isolated mitochondria to Bid. *Exp. Cell. Res.* **278**(1): 101-111, 2002.
- Broker L.E., Huisman C., Span S.W., Rodriguez J.A., Krut F.A., Giaccone G.: Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* **64**(1): 27-30, 2004.
- Brown S.B., Brown E.A., Walker I.: The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet. Oncol.* **5**(8): 497-508, 2004.
- Bursch R.: Multiple cell death programs: Charon's lifts to Hades. *FEMS Yeast Res.* **5**(2): 101-110, 2004.
- Bursch W., Ellinger A., Gerner C., Frohwein U., Schulte-Hermann R.: Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **926**: 1-12, 2000.
- Buss J.L., Greene B.T., Turner J., Torti F.M., Torti S.V.: Iron chelators in cancer chemotherapy. *Curr. Top. Med. Chem.* **4**(15): 1623-1635, 2004.
- Buss J.L., Neuzil J., Gellert N., Weber C., Ponka P.: Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs induce apoptosis in hematopoietic cells due to their iron-chelating properties. *Biochem. Pharmacol.* **65**: 161-172, 2003.
- Canti G., Lattuada D., Nicolin A., Taroni P., Valentini G., Cubeddu R.: Antitumor immunity induced by photodynamic therapy with aluminum disulfonated phthalocyanines and laser light. *Anticancer Drugs* **5**(4): 443-447, 1994.
- Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R.: Mechanisms in photodynamic therapy: part-one photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**: 279-293, 2004.
- Castano A.P., Mroz P., Hamblin M.R.: Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* **6**(7): 535-545, 2006.

- Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R.: Mechanisms in photodynamic therapy: part-three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2**: 91-106, 2004b.
- Cirman T., Oresic K., Mazovec G.D., Turk V., Reed J.C., Myers R.M., Salvesen G.S., Turk B.: Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J. Biol. Chem.* **279**(5): 3578-3587, 2004.
- Corazza N., Jakob S., Schaer C., Frese S., Keogh A., Stroka D., Kassahn D., Torgler R., Mueller C., Schneider P., Brunner T.: TRAIL receptor-mediated JNK activation and Bim phosphorylation critically regulate Fas-mediated liver damage and lethality. *J. Clin. Invest.* **116**(9): 2493-2499, 2006.
- Cornelis S., Bruynooghe Y., Van Loo G., Saelens X., Vandenabeele P., Beyaert R.: Apoptosis of hematopoietic cells induced by growth factor withdrawal is associated with caspase-9 mediated cleavage of Raf-1. *Oncogene* **24**(9): 1552-1562, 2005.
- Cory S., Adams J.M.: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* **2**(9): 647-56, 2002.
- Cozzi A., Levi S., Corsi B., Santambrogio P., Campanella A., Gerardi G., Arosio P.: Role of iron and ferritin in TNF α -induced apoptosis in HeLa cells. *FEBS Lett.* **537**(1-3): 187-192, 2003.
- Creagh E.M., Conroy H., Martin S.J.: Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol. Rev.* **193**: 10-21, 2003.
- Crown J., O'Leary M., Ooi W.S.: Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *Oncologist* **9**(Suppl 2): 24-32, 2004.
- Curtin J.F., Cotter T.G.: Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal.* **15**(11): 983-892, 2003.
- Dare E., Li W., Zhivotovsky B., Yuan X., Ceccatelli S.: Methylmercury and H₂O₂ provoke lysosomal damage in human astrocytoma D384 cells followed by apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **30**(12): 1347-1356, 2001.
- Day T.W., Najafi F., Wu C.H., Safa A.R.: Cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP): a novel target for Taxol-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **71**(11): 1551-1561, 2006.
- Dean M., Fojo T., Bates S.: Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* **5**(4): 275-284, 2005.
- Debnath J., Baehrecke E.H., Kroemer G.: Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* **1**(2): 66-74, 2005.
- Demidova T.N., Hamblin M.R.: Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **17**(3): 245-254, 2004.
- Deng X., Gao F., Flagg T., Anderson J., May W.S.: Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol. Cell. Biol.* **26**(12): 4421-4434, 2006.
- Desai P.B., Duan J.Z., Zhu Y.W., Kouzi S.: Human liver microsomal metabolism of paclitaxel and drug interactions. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **23**(3): 417-424, 1998.
- Devireddy L.R., Gazin C., Zhu X., Green M.R.: A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* **123**(7): 1293-3305, 2005.
- Devireddy L.R., Teodoro J.G., Richard F.A., Green M.R.: Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science* **293**(5531): 829-834, 2001.

- Diaz J.F., Barasoain I., Souto A.A., Amat-Guerri F., Andreu J.M.: Macromolecular accessibility of fluorescent taxoids bound at a paclitaxel binding site in the microtubule surface. *J. Biol. Chem.* **280**(5): 3928-3937, 2005.
- Dickson D.W.: Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J. Clin. Invest.* **114**(1): 23-27, 2004.
- Dolmans D.E., Kadambi A., Hill J.S., Waters C.A., Robinson B.C., Walker J.P., Fukumura D., Jain R.K.: Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy. *Cancer Res.* **62**(7): 2151-2156, 2002.
- Donepudi M., Grutter M.G.: Structure and zymogen activation of caspases. *Biophys. Chem.* **101-102**: 145-153, 2002.
- Dorr R.T.: Pharmacology of the taxanes. *Pharmacotherapy* **17**(5 Pt 2): 96S-104S, 1997.
- Duijnhoven F.H., Aalbers R.I., Rovers J.P., Terpstra O.T., Kuppen P.J.: The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review. *Immunobiology* **207**(2): 105-113, 2003.
- Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H.: Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 383-424, 1999.
- Ehrlichova M., Koc M., Truksa J., Nadova Z., Vaclavikova R., Kovar J.: Cell death induced by taxanes in breast cancer cells: cytochrome C is released in resistant but not in sensitive cells. *Anticancer Res.* **25**(6B): 4215-4224, 2005.
- Emery-Goodman A., Hirling H., Scarpellino L., Henderson B., Kuhn L.C.: Iron regulatory factor expressed from recombinant baculovirus: conversion between the RNA-binding apoprotein and Fe-S cluster containing aconitase. *Nucleic Acids Res.* **21**(6): 1457-1461, 1993.
- Faulk W.P., Hsi B.L., Stevens P.J.: Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. *Lancet.* **2**(8191): 390-392, 1980.
- Ferlini C., Distefano M., Pignatelli F., Lin S., Riva A., Bombardelli E., Mancuso S., Ojima I., Scambia G.: Antitumour activity of novel taxanes that act at the same time as cytotoxic agents and P-glycoprotein inhibitors. *Br. J. Cancer* **83**(12): 1762-1768, 2000.
- Ferlini C., Ojima I., Distefano M., Gallo D., Riva A., Morazzoni P., Bombardelli E., Mancuso S., Scambia G.: Second generation taxanes: from the natural framework to the challenge of drug resistance. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **3**(2): 133-138, 2003a.
- Ferlini C., Raspaglio G., Mozzetti S., Distefano M., Filippetti F., Martinelli E., Ferrandina G., Gallo D., Ranelletti F.O., Scambia G.: Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance. *Mol. Pharmacol.* **64**(1): 51-58, 2003b.
- Ferri K.F., Kroemer G.: Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell. Biol.* **3**(11): E255-263, 2001.
- Festjens N., Cornelis S., Lamkanfi M., Vandenaabeele P.: Caspase-containing complexes in the regulation of cell death and inflammation. *Biol. Chem.* **387**(8): 1005-1016, 2006.
- Feun L., Modiano M., Lee K., Mao J., Marini A., Savaraj N., Plezia P., Almassian B., Colacino E., Fischer J., MacDonald S.: Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **50**(3): 223-229, 2002.
- Fields A.L., Runowicz C.D.: Current therapies in ovarian cancer. *Cancer Invest.* **21**(1): 148-156, 2003.
- Fietta P.: Many ways to die: passive and active cell death styles. *Riv. Biol.* **99**(1): 69-83, 2006.

- Fingar V.H., Siegel K.A., Wieman T.J., Doak K.W.: The effects of thromboxane inhibitors on the microvascular and tumor response to photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **58**(3): 393-399, 1993.
- Fischer U., Janicke R.U., Schulze-Osthoff K.: Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* **10**(1): 76-100, 2003.
- Fitzpatrick F.A., Wheeler R.: The immunopharmacology of paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotere), and related agents. *Int. Immunopharmacol.* **3**(13-14): 1699-1714, 2003.
- Frank J., Lambert C., Biesalski H.K., Thews O., Vaupel P., Kelleher D.K.: Intensified oxidative and nitrosative stress following combined ALA-based photodynamic therapy and local hyperthermia in rat tumors. *Int. J. Cancer.* **107**(6): 941-948, 2003.
- Fridman J.S., Lowe S.W.: Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**(56): 9030-9040, 2003.
- Fukuchi K., Tomoyasu S., Tsuruoka N., Gomi K.: Iron deprivation-induced apoptosis in HL-60 cells. *FEBS Lett.* **350**(1): 139-142, 1994.
- Fukuchi K., Tomoyasu S., Watanabe H., Kaetsu S., Tsuruoka N., Gomi K.: Iron deprivation results in an increase in p53 expression. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **376**(10): 627-630, 1995.
- Furre I.E., Moller M.T., Shahzidi S., Nesland J.M., Peng Q.: Involvement of both caspase-dependent and -independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells. *Apoptosis* **11**(11): 2031-2042, 2006.
- Ganansia-Leymarie V., Bischoff P., Bergerat J.P., Holl V.: Signal transduction pathways of taxanes-induced apoptosis. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **3**(4): 291-306, 2003.
- Gangemi R.M., Santamaria B., Bargellesi A., Cosulich E., Fabbi M.: Late apoptotic effects of taxanes on K562 erythroleukemia cells: apoptosis is delayed upstream of caspase-3 activation. *Int. J. Cancer* **85**(4): 527-533, 2000.
- Ganz T.: Cellular iron: ferroportin is the only way out. *Cell. Metab.* **1**(3): 155-157, 2005.
- Genev R., Chen J., Ojima I.: Recent advances in the new generation taxane anticancer agents. *Med. Chem.* **1**(2): 125-139, 2005.
- Genev R., Ungureanu M., Li D., Ojima I.: Overcoming multidrug resistance in taxane chemotherapy. *Clin. Chem. Lab. Med.* **40**(9): 918-925, 2002.
- Gevaert K., Vandekerckhove J., Declercq W., Vandenabeele P.: The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* **9**(1): 20-26, 2002.
- Gilissen M.J., van de Merbel-de Wit L.E., Star W.M., Koster J.F., Sluiter W.: Effect of photodynamic therapy on the endothelium-dependent relaxation of isolated rat aortas. *Cancer Res.* **53**(11): 2548-2552, 1993.
- Gozuacik D., Kimchi A.: Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* **23**(16): 2891-2906, 2004.
- Grootveld M., Bell J.D., Halliwell B., Aruoma O.I., Bomford A., Sadler P.J.: Non-transferrin-bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis. Characterization by high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **264**(8): 4417-4422, 1989.
- Gruber C., Henkel M., Budach W., Belka C., Jendrossek V.: Involvement of tyrosine kinase p56/Lck in apoptosis induction by anticancer drugs. *Biochem. Pharmacol.* **67**(10): 1859-1872, 2004.

- Guan B., Yue P., Clayman G.L., Sun S.Y.: Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene. *J. Cell. Physiol.* **188**(1): 98-105, 2001.
- Guastalla J.P. 3rd, Dieras V.: The taxanes: toxicity and quality of life considerations in advanced ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **89**(Suppl 3): S16-22, 2003.
- Guicciardi M.E., Leist M., Gores G.J.: Lysosomes in cell death. *Oncogene* **23**(16): 2881-2890, 2004.
- Gunshin H., Starr C.N., Drenzo C., Fleming M.D., Jin J., Greer E.L., Sellers V.M., Galica S.M., Andrews N.C.: Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood* **106**(8): 2879-2883, 2005.
- Haldar S., Basu A., Croce C.M.: Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res.* **57**(2): 229-233, 1997.
- Haldar S., Jena N., Croce C.M.: Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(10): 4507-4011, 1995.
- Haq R.U., Wereley J.P., Chitambar C.R.: Induction of apoptosis by iron deprivation in human leukemic CCRF-CEM cells. *Exp. Hematol.* **23**(5): 428-432, 1995.
- Hendrzak-Henion J.A., Knisely T.L., Cincotta L., Cincotta E., Cincotta A.H.: Role of the immune system in mediating the antitumor effect of benzophenothiazine photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **69**(5): 575-581, 1999.
- Hentze M.W., Kuhn L.C.: Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(16): 8175-8182, 1996.
- Hentze M.W., Muckenthaler M.U., Andrews N.C.: Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**(3): 285-297, 2004.
- Hileti D., Panayiotidis P., Hoffbrand A.V.: Iron chelators induce apoptosis in proliferating cells. *Br. J. Haematol.* **89**(1): 181-187, 1995.
- Hipfner D.R., Cohen S.M.: Connecting proliferation and apoptosis in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**(10): 805-815, 2004.
- Houseweart M.K., Pennacchio L.A., Vilaythong A., Peters C., Noebels J.L., Myers R.M.: Cathepsin B but not cathepsins L or S contributes to the pathogenesis of Unverricht-Lundborg progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *J. Neurobiol.* **56**(4): 315-327, 2003.
- Huang Z.: A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technol. Cancer Res. Treat.* **4**(3): 283-93, 2005.
- Hurley J., Doliny P., Reis I., Silva O., Gomez-Fernandez C., Velez P., Pauletti G., Powell J.E., Pegram M.D., Slamon D.J.: Docetaxel, cisplatin, and trastuzumab as primary systemic therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive locally advanced breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**(12): 1831-1838, 2006.
- Chakravarthy A.B., Kelley M.C., McLaren B., Truica C.I., Billheimer D., Mayer I.A., Grau A.M., Johnson D.H., Simpson J.F., Beauchamp R.D., Jones C., Pietenpol J.A.: Neoadjuvant concurrent paclitaxel and radiation in stage II/III breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**(5): 1570-1576, 2006.
- Chekulayeva L.V., Shevchuk I.N., Chekulayev V.A.: Influence of temperature on the efficiency of photodestruction of Ehrlich ascites carcinoma cells sensitized by hematoporphyrin derivative. *Exp. Oncol.* **26**(2): 125-139, 2004.
- Chen J.G., Yang C.P., Cammer M., Horwitz S.B.: Gene expression and mitotic exit induced by microtubule-stabilizing drugs. *Cancer Res.* **63**(22): 7891-7899, 2003.

- Cheng E.H., Wei M.C., Weiler S., Flavell R.A., Mak T.W., Lindsten T., Korsmeyer S.J.: BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* **8**(3): 705-711, 2001.
- Cherukuri S., Potla R., Sarkar J., Nurko S., Harris Z.L., Fox P.L.: Unexpected role of ceruloplasmin in intestinal iron absorption. *Cell. Metab.* **2**(5): 309-319, 2005.
- Chipuk J.E., Bouchier-Hayes L., Kuwana T., Newmeyer D.D., Green D.R.: PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* **309**(5741): 1732-1735, 2005.
- Chipuk J.E., Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Droin N.M., Newmeyer D.D., Schuler M., Green D.R.: Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**(5660): 1010-1014, 2004.
- Chitambar C.R.: Gallium compounds as antineoplastic agents. *Curr. Opin. Oncol.* **16**(6): 547-552, 2004a.
- Chitambar C.R.: Apoptotic mechanisms of gallium nitrate: basic and clinical investigations. *Oncology (Williston Park)*. **18**(13 Suppl 10): 39-44, 2004b.
- Chong T.W., Horwitz L.D., Moore J.W., Sowter H.M., Harris A.L.: A mycobacterial iron chelator, desferri-exochelin, induces hypoxia-inducible factors 1 and 2, NIP3, and vascular endothelial growth factor in cancer cell lines. *Cancer Res.* **62**(23): 6924-6927, 2002.
- Chu Q., Vincent M., Logan D., Mackay J.A., Evans W.K.: Taxanes as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and practice guideline. *Lung Cancer* **50**(3): 355-374, 2005.
- Ido Y., Muto N., Inada A., Kohroki J., Mano M., Odani T., Itoh N., Yamamoto K., Tanaka K.: Induction of apoptosis by hinokitiol, a potent iron chelator, in teratocarcinoma F9 cells is mediated through the activation of caspase-3. *Cell Prolif.* **32**(1): 63-73, 1999.
- Jakupec M.A., Keppler B.K.: Gallium in cancer treatment. *Curr. Top. Med. Chem.* **4**(15):1575-1583, 2004.
- Jiang X.P., Wang F., Yang D.C., Elliott R.L., Head J.F.: Induction of apoptosis by iron depletion in the human breast cancer MCF-7 cell line and the 13762NF rat mammary adenocarcinoma in vivo. *Anticancer Res.* **22**(5): 2685-2692, 2002.
- Jordan M.A., Ojima I., Rosas F., Distefano M., Wilson L., Scambia G., Ferlini C.: Effects of novel taxanes SB-T-1213 and IDN5109 on tubulin polymerization and mitosis. *Chem. Biol.* **9**(1): 93-101, 2002.
- Jordan M.A., Wilson L.: Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* **4**(4): 253-265, 2004.
- Jori G.: Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **25**(1-2): 505-519, 2006.
- Kagedal K., Johansson A.C., Johansson U., Heimlich G., Roberg K., Wang N.S., Jurgensmeier J.M., Ollinger K.: Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis-involvement of Bax? *Int. J. Exp. Pathol.* **86**(5): 309-321, 2005.
- Kagedal K., Zhao M., Svensson I., Brunk U.T.: Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem. J.* **359**(Pt 2): 335-343, 2001.
- Kaptain S., Downey W.E., Tang C., Philpott C., Haile D., Orloff D.G., Harford J.B., Rouault T.A., Klausner R.D.: A regulated RNA binding protein also possesses aconitase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**(22): 10109-10113, 1991.

- Kawabata H., Germain R.S., Vuong P.T., Nakamaki T., Said J.W., Koeffler H.P.: Transferrin receptor 2- α supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *J. Biol. Chem.* **275**(22): 16618-16625, 2000.
- Kawabata H., Yang R., Hiramata T., Vuong P.T., Kawano S., Gombart A.F., Koeffler H.P.: Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J. Biol. Chem.* **274**(30): 20826-20832, 1999.
- Keer H.N., Kozlowski J.M., Tsai Y.C., Lee C., McEwan R.N., Grayhack J.T.: Elevated transferrin receptor content in human prostate cancer cell lines assessed in vitro and in vivo. *J. Urol.* **43**(2): 381-385, 1990.
- Kelbauskas L., Diemel W.: Internalization of aggregated photosensitizers by tumor cells: subcellular time-resolved fluorescence spectroscopy on derivatives of pyropheophorbide-a ethers and chlorin e6 under femtosecond one- and two-photon excitations. *Photochem. Photobiol.* **76**(6): 686-694, 2002.
- Kemp J.D., Cardillo T., Stewart B.C., Kehrberg E., Weiner G., Hedlund B., Naumann P.W.: Inhibition of lymphoma growth in vivo by combined treatment with hydroxyethyl starch deferoxamine conjugate and IgG monoclonal antibodies against the transferrin receptor. *Cancer Res.* **55**(17): 3817-3824, 1995.
- Kemp J.D., Thorson J.A., Stewart B.C., Naumann P.W.: Inhibition of hematopoietic tumor growth by combined treatment with deferoxamine and an IgG monoclonal antibody against the transferrin receptor: evidence for a threshold model of iron deprivation toxicity. *Cancer Res.* **52**(15): 4144-4148, 1992.
- Kicic A., Chua A.C., Baker E.: The desferrithiocin (DFT) class of iron chelators: potential as antineoplastic agents. *Anticancer Drug. Des.* **16**(4-5): 195-207, 2001.
- Kim B.S., Yoon K.H., Oh H.M., Choi E.Y., Kim S.W., Han W.C., Kim E.A., Choi S.C., Kim T.H., Yun K.J., Kim E.C., Lyoo J.H., Nah Y.H., Chung H.T., Cha Y.N., Jun C.D.: Involvement of p38 MAP kinase during iron chelator-mediated apoptotic cell death. *Cell Immunol.* **220**(2): 96-106, 2002.
- Kim H., Rafiuddin-Shah M., Tu H.C., Jeffers J.R., Zambetti G.P., Hsieh J.J., Cheng E.H.: Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat. Cell Biol.* **8**(12): 1348-1358, 2006.
- Kim S., Ponka P.: Effects of interferon-gamma and lipopolysaccharide on macrophage iron metabolism are mediated by nitric oxide-induced degradation of iron regulatory protein 2. *J. Biol. Chem.* **275**(9): 6220-6226, 2000.
- Kim Y.M., Chung H.T., Simmons R.L., Billiar T.R.: Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.* **275**(15): 10954-10961, 2000.
- Kinchen J.M., Hengartner M.O.: Tales of cannibalism, suicide, and murder: Programmed cell death in *C. elegans*. *Curr. Top. Dev. Biol.* **65**: 1-45, 2005.
- Kischkel F.C., Lawrence D.A., Chuntharapai A., Schow P., Kim K.J., Ashkenazi A.: Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* **12**(6): 611-620, 2000.
- Kobayashi S., Yamashita K., Takeoka T., Ohtsuki T., Suzuki Y., Takahashi R., Yamamoto K., Kaufmann S.H., Uchiyama T., Sasada M., Takahashi A.: Calpain-mediated X-linked inhibitor of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia. *J. Biol. Chem.* **277**(37): 33968-33977, 2002.
- Koc M., Nadova Z., Kovar J.: Sensitivity of cells to apoptosis induced by iron deprivation can be reversibly changed by iron availability. *Cell Prolif.* **39**: 551-561, 2006.

- Koc M., Nad'ova Z., Truksa J., Ehrlichova M., Kovar J.: Iron deprivation induces apoptosis via mitochondrial changes related to Bax translocation. *Apoptosis* **10**(2): 381-393, 2005.
- Kondo Y., Kondo S.: Autophagy and cancer therapy. *Autophagy* **2**(2): 85-90, 2006.
- Korbelik M., Dougherty G.J.: Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. *Cancer Res.* **59**(8): 1941-1946, 1999.
- Korbelik M., Krosi G., Krosi J., Dougherty G.J.: The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. *Cancer Res.* **56**(24): 5647-5652, 1996.
- Korbelik M.: Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **14**(5): 329-334, 1996.
- Kotamraju S., Chitambar C.R., Kalivendi S.V., Joseph J., Kalyanaraman B.: Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells: role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**(19): 17179-17187, 2002.
- Kotamraju S., Tampo Y., Kalivendi S.V., Joseph J., Chitambar C.R., Kalyanaraman B.: Nitric oxide mitigates peroxide-induced iron-signaling, oxidative damage, and apoptosis in endothelial cells: role of proteasomal function? *Arch. Biochem. Biophys.* **423**(1): 74-80, 2004.
- Koul D., Takada Y., Shen R., Aggarwal B.B., Yung W.K.: PTEN enhances TNF-induced apoptosis through modulation of nuclear factor-kappaB signaling pathway in human glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**(2): 463-471, 2006.
- Kovar J., Stunz L.L., Stewart B.C., Kriegerbeckova K., Ashman R.F., Kemp J.D.: Direct evidence that iron deprivation induces apoptosis in murine lymphoma 38C13. *Pathobiology* **65**(2): 61-68, 1997.
- Kovar J., Valenta T., Stybrova H.: Differing sensitivity of tumor cells to apoptosis induced by iron deprivation in vitro. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **37**(7): 450-458: 2001.
- Kralova J., Synytsya A., Pouckova P., Koc M., Dvorak M., Kral V.: Novel porphyrin conjugates with a potent photodynamic antitumor effect: differential efficacy of mono- and bis-beta-cyclodextrin derivatives in vitro and in vivo. *Photochem. Photobiol.* **82**(2): 432-438, 2006.
- Krammer B.: Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Res.* **21**(6B): 4271-4277, 2001.
- Kroemer G., Martin S.J.: Caspase-independent cell death. *Nat. Med.* **11**(7): 725-730, 2005.
- Kruszewski M.: Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat. Res.* **531**(1-2): 81-92, 2003.
- Kumar S.: Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* **14**(1): 32-43, 2007.
- Kuranaga E., Miura M.: Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination. *Trends Cell Biol.* **17**(3): 135-144, 2007.
- Kuwana T., Mackey M.R., Perkins G., Ellisman M.H., Latterich M., Schneider R., Green D.R., Newmeyer D.D.: Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell.* **111**(3): 331-342, 2002.
- Kuznetsova L., Chen J., Sun L., Wu X., Pepe A., Veith J.M., Pera P., Bernacki R.J., Ojima I.: Syntheses and evaluation of novel fatty acid-second-generation taxoid conjugates as promising anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**(4): 974-977, 2006.
- Kyu-Ho Han E., Gehrke L., Tahir S.K., Credo R.B., Cherian S.P., Sham H., Rosenberg S.H., Ng S.: Modulation of drug resistance by alpha-tubulin in paclitaxel-resistant human lung cancer cell lines. *Eur. J. Cancer* **36**(12): 1565-1571, 2000.

- Lam E., Kato N., Lawton M.: Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**(6839): 848-853, 2001.
- Lam E.: Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**(4): 305-315, 2004.
- Lambrechts S.A., Demidova T.N., Aalders M.C., Hasan T., Hamblin M.R.: Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**(7): 503-509, 2005.
- Lamkanfi M., Festjens N., Declercq W., Vanden Berghe T., Vandenabeele P.: Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ.* **14**(1): 44-55, 2007.
- Lavin M.F., Gueven N.: The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ.* **13**(6): 941-950, 2006.
- Lavrik I.N., Golks A., Baumann S., Krammer P.H.: Caspase-2 is activated at the CD95 death-inducing signaling complex in the course of CD95-induced apoptosis. *Blood* **108**(2): 559-565, 2006.
- Le N.T., Richardson D.R.: The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1603**(1): 31-46, 2002.
- Lee S.K., Jang H.J., Lee H.J., Lee J., Jeon B.H., Jun C.D., Lee S.K., Kim E.C.: p38 and ERK MAP kinase mediates iron chelator-induced apoptosis and –suppressed differentiation of immortalized and malignant human oral keratinocytes. *Life Sci.* **79**(15): 1419-1427, 2006a.
- Lee S.K., Lee J.J., Lee H.J., Lee J., Jeon B.H., Jun C.D., Lee S.K., Kim E.C.: Iron chelator-induced growth arrest and cytochrome c-dependent apoptosis in immortalized and malignant oral keratinocytes. *J. Oral Pathol. Med.* **35**(4): 218-226, 2006b.
- Leu J.I., Dumont P., Hafey M., Murphy M.E., George D.L.: Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat. Cell. Biol.* **6**(5): 443-450, 2004.
- Li J., Lee B., Lee A.S.: Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J. Biol. Chem.* **281**(11): 7260-7270, 2006.
- Li M., Luo J., Brooks C.L., Gu W.: Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J. Biol. Chem.* **277**(52): 50607-50611, 2002.
- Li Z., Ibrahim N.K., Wathen J.K., Wang M., Mante Menchu R.P., Valero V., Theriault R., Buzdar A.U., Hortobagyi G.N.: Colitis in patients with breast carcinoma treated with taxane-based chemotherapy. *Cancer* **101**(7): 1508-1513, 2004.
- Lieuallen K., Pennacchio L.A., Park M., Myers R.M., Lennon G.G.: Cystatin B-deficient mice have increased expression of apoptosis and glial activation genes. *Hum. Mol. Genet.* **10**(18): 1867-1871, 2001.
- Ling X., Bernacki R.J., Brattain M.G., Li F.: Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest. *J. Biol. Chem.* **279**(15): 15196-15203, 2004.
- Llambi F., Causeret F., Bloch-Gallego E., Mehlen P.: Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J.* **20**(11): 2715-2722, 2001.
- Loo G., Gulp M., Depuydt B., Srinivasula S.M., Rodriguez I., Alnemri E.S., Gevaert K., Vandekerckhove J., Declercq W., Vandenabeele P.: The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* **9**(1): 20-26, 2002.

- Luksiene Z.: Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas)* **39**(12): 1137-1150, 2003.
- Mabuchi S., Ohmichi M., Nishio Y., Hayasaka T., Kimura A., Ohta T., Kawagoe J., Takahashi K., Yada-Hashimoto N., Seino-Noda H., Sakata M., Motoyama T., Kurachi H., Testa J.R., Tasaka K., Murata Y.: Inhibition of inhibitor of nuclear factor-kappaB phosphorylation increases the efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *Clin. Cancer Res.* **10**(22): 7645-7654, 2004.
- MacLean K.H., Cleveland J.R.L., Porter J.B.: Cellular zinc content is a major determinant of iron chelator-induced apoptosis of thymocytes. *Blood* **98**: 3831-3839, 2001.
- Maisch T., Bosl C., Szeimies R.M., Lehn N., Abels C.: Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**(4): 1542-1552, 2005.
- Maisch T., Szeimies R.M., Jori G., Abels C.: Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**(10): 907-917, 2004.
- Malingre M.M., Beijnen J.H., Schellens J.H.: Oral delivery of taxanes. *Invest. New Drugs* **19**(2): 155-162, 2001.
- Mandic A., Viktorsson K., Strandberg L., Heiden T., Hansson J., Linder S., Shoshan M.C.: Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **22**(9): 3003-3013, 2002.
- Manna S.K., Zhang H.J., Yan T., Oberley L.W., Aggarwal B.B.: Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J. Biol. Chem.* **273**(21): 13245-13254, 1998.
- Matsubara H., Mizutani Y., Hongo F., Nakanishi H., Kimura Y., Ushijima S., Kawauchi A., Tamura T., Sakata T., Miki T.: Gene therapy with TRAIL against renal cell carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **5**(9): 2165-2171, 2006.
- Mattson M.P.: Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**(2): 120-129, 2000.
- Mehlen P., Thibert C.: Dependence receptors: between life and death. *Cell Mol. Life Sci.* **61**(15): 1854-1866, 2004.
- Milhas D., Cuvillier O., Therville N., Clave P., Thomsen M., Levade T., Benoist H., Segui B.: Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **280**(20): 19836-19842, 2005.
- Miller M.L., Ojima I.: Chemistry and chemical biology of taxane anticancer agents. *Chem. Rec.* **1**(3): 195-211, 2001.
- Miyashita T., Reed J.C.: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**(2): 293-299, 1995.
- Moos P.J., Fitzpatrick F.A.: Taxanes propagate apoptosis via two cell populations with distinctive cytological and molecular traits. *Cell Growth Differ.* **9**(8): 687-697, 1998.
- Moura I.C., Lepelletier Y., Arnulf B., England P., Baude C., Beaumont C., Bazarbachi A., Benhamou M., Monteiro R.C., Hermine O.: A neutralizing monoclonal antibody (mAb A24) directed against the transferrin receptor induces apoptosis of tumor T lymphocytes from ATL patients. *Blood* **103**(5): 1838-1845, 2004.
- Nagata S., Obana A., Gohto Y., Nakajima S.: Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na). *Lasers Surg. Med.* **33**(1): 64-70, 2003.

- Nakagawa T., Yuan J.: Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.* **150**(4): 887-894, 2000.
- Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., Yuan J.: Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**(6765): 98-103, 2000.
- Ng P.P., Helguera G., Daniels T.R., Lomas S.Z., Rodriguez J.A., Schiller G., Bonavida B., Morrison S.L., Penichet M.L.: Molecular events contributing to cell death in malignant human hematopoietic cells elicited by an IgG3-avidin fusion protein targeting the transferrin receptor. *Blood* **108**(8): 2745-2754, 2006.
- Ofir R., Seidman R., Rabinski T., Krup M., Yavelsky V., Weinstein Y., Wolfson M.: Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. *Cell Death Differ.* **9**(6): 636-642, 2002.
- Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I.: The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**(1): 1-21, 2002.
- Onda T., Katsumata N., Tsunematsu R., Yasugi T., Mushika M., Yamamoto K., Fujii T., Hirakawa T., Kamura T., Saito T., Yoshikawa H.: Cisplatin, paclitaxel and escalating doses of doxorubicin (TAP) in advanced ovarian cancer: a phase I trial. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **34**(9): 540-546, 2004.
- Owen-Schaub L.B., Zhang W., Cusack J.C., Angelo L.S., Santee S.M., Fujiwara T., Roth J.A., Deisseroth A.B., Zhang W.W., Kruzel E.: Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol. Cell Biol.* **15**(6): 3032-3040, 1995.
- Park S.J., Wu C.H., Gordon J.D., Zhong X., Emami A., Safa A.R.: Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. *J. Biol. Chem* **279**(49): 51057-51067, 2004.
- Petros A.M., Olejniczak E.T., Fesik S.W.: Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1644**(2-3): 83-94, 2004.
- Porter J.B., Lynagh G.R., Hider R.C.: Iron chelators promote apoptosis in thymocytes and proliferating leukaemia cells (Abstract). *Brit. J. Haematol.* **87**: 114, 1994.
- Pratt M.A., Niu M.Y., Renart L.I., Regulation of survivin by retinoic acid and its role in paclitaxel-mediated cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* **11**(4): 589-605, 2006.
- Proskuryakov S.Y., Konoplyannikov A.G., Gabai V.L.: Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* **283**(1): 1-16, 2003.
- Qing Y., Shuo W., Zhihua W., Huifen Z., Ping L., Lijiang L., Xiaorong Z., Liming C., Daiwen X., Yu H., Wei X., Min F., Zuohua F., Guanxin S.: The in vitro antitumor effect and in vivo tumor-specificity distribution of human-mouse chimeric antibody against transferrin receptor. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**(9): 1111-1121, 2006.
- Rabizadeh S., Ye X., Sperandio S., Wang J.J., Ellerby H.M., Ellerby L.M., Giza C., Andrusiak R.L., Frankowski H., Yaron Y., Moayeri N.N., Rovelli G., Evans C.J., Butcher L.L., Nolan G.P., Assa-Munt N., Bredesen D.E.: Neurotrophin dependence domain: a domain required for the mediation of apoptosis by the p75 neurotrophin receptor. *J. Mol. Neurosci.* **15**(3): 215-229, 2000.
- Ragazzi E., D'Ancona S., Berti E., Carrara M.: Cytotoxicity of paclitaxel in combination with cisplatin and a new Pt-mercaptopyridine complex. *Anticancer Res.* **22**(5): 2783-2788, 2002.
- Rakba N., Loyer P., Gilot D., Delcros J.G., Glaise D., Baret P., Pierre J.L., Brissot P., Lescoat G.: Antiproliferative and apoptotic effects of O-Trensox, a new synthetic iron chelator, on differentiated human hepatoma cell lines. *Carcinogenesis* **21**(5): 943-951, 2000.

- Rees D.C., Howard J.B.: The interface between the biological and inorganic worlds: iron-sulfur metalloclusters. *Science* **300**(5621): 929-931, 2003.
- Ricote M., Garcia-Tunon I., Fraile B., Fernandez C., Aller P., Paniagua R., Royuela M.: P38 MAPK protects against TNF-alpha-provoked apoptosis in LNCaP prostatic cancer cells. *Apoptosis* **11**(11): 1969-1975, 2006.
- Richardson D.R., Ponka P.: The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1331**(1): 1-40, 1997.
- Richardson D.R.: Analogues of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) as potential iron chelators for the treatment of neoplasia. *Leuk. Lymphoma* **31**(1-2): 47-60, 1998.
- Rudnev A.V., Foteeva L.S., Kowol C., Berger R., Jakupec M.A., Arion V.B., Timerbaev A.R., Keppler B.K.: Preclinical characterization of anticancer gallium(III) complexes: solubility, stability, lipophilicity and binding to serum proteins. *J. Inorg. Biochem.* **100**(11): 1819-1826, 2006.
- Salvesen G.S., Duckett C.S.: IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**(6): 401-410, 2002.
- Sarkar B.: State of iron(3) in normal human serum: low molecular weight and protein ligands besides transferrin. *Can. J. Biochem.* **48**(12): 1339-1350, 1970.
- Sax J.K., El-Deiry W.S.: p53 downstream targets and chemosensitivity. *Cell Death Differ.* **10**(4): 413-417, 2003.
- Sax J.K., Fei P., Murphy M.E., Bernhard E., Korsmeyer S.J., El-Deiry W.S.: BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat. Cell Biol.* **4**(11): 842-849, 2002.
- Scatena C.D., Stewart Z.A., Mays D., Tang L.J., Keefer C.J., Leach S.D., Pietenpol J.A.: Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest. *J. Biol. Chem.* **273**(46): 30777-30784, 1998.
- Scorrano L., Oakes S.A., Opferman J.T., Cheng E.H., Sorcinelli M.D., Pozzan T., Korsmeyer S.J.: BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* **300**(5616): 135-139, 2003.
- Scott F.L., Denault J.B., Riedl S.J., Shin H., Renatus M., Salvesen G.S.: XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J.* **24**(3): 645-655, 2005.
- Sen S.: Programmed cell death: concept, mechanism and control. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **67**(3): 287-319, 1992.
- Sharpe J.C., Arnoult D., Youle R.J.: Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim. Biophys. Acta* **1644**(2-3): 107-113, 2004.
- Shayeghi M., Latunde-Dada G.O., Oakhill J.S., Laftah A.H., Takeuchi K., Halliday N., Khan Y., Warley A., McCann F.E., Hider R.C., Frazer D.M., Anderson G.J., Vulpe C.D., Simpson R.J., McKie A.T.: Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* **122**(5): 789-801, 2005.
- Shi Y.: Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* **117**(7): 855-858, 2004.
- Shoshan-Barmatz V., Israelson A., Brdiczka D., Sheu S.S.: The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr. Pharm.* **12**(18): 2249-2270, 2006.
- Shou M., Martinet M., Korzekwa K.R., Krausz K.W., Gonzalez F.J., Gelboin H.V.: Role of human cytochrome P450 3A4 and 3A5 in the metabolism of taxotere and its derivatives: enzyme specificity, interindividual distribution and metabolic contribution in human liver. *Pharmacogenetics* **8**(5): 391-401, 1998.

- Schinzel A., Kaufmann T., Borner C.: Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion, and changes in subcellular localization. *Biochim. Biophys. Acta* **1644**(2-3): 95-105, 2004.
- Schlawe D., Majdalani A., Velcicky J., Hessler E., Wieder T., Prokop A., Schmalz H.G.: Iron-containing nucleoside analogues with pronounced apoptosis-inducing activity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**(13): 1731-1734, 2004.
- Schotte P., Van Criekinge W., Van de Craen M., Van Loo G., Desmedt M., Grooten J., Cornelissen M., De Ridder L., Vandekerckhove J., Fiers W., Vandenabeele P., Beyaert R.: Cathepsin B-mediated activation of the proinflammatory caspase-11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**(1): 379-387, 1998.
- Sit A.S., Kelley J.L., Gallion H.H., Kunschner A.J., Edwards R.P.: Paclitaxel and carboplatin for recurrent or persistent cancer of the cervix. *Cancer Invest.* **22**(3): 368-373, 2004.
- Song Z., Yao X., Wu M.: Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**(25): 23130-23140, 2003.
- Sprick M.R., Rieser E., Stahl H., Grosse-Wilde A., Weigand M.A., Walczak H.: Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.* **21**(17): 4520-4530, 2002.
- Srinivasula S.M., Datta P., Fan X.J., Fernandes-Alnemri T., Huang Z., Alnemri E.S.: Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J. Biol. Chem.* **275**(46): 36152-36157, 2000.
- Srivastava R.K., Srivastava A.R., Korsmeyer S.J., Nesterova M., Cho-Chung Y.S., Longo D.L.: Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell Biol.* **18**(6): 3509-3517, 1998.
- Stennicke H.R., Salvesen G.S.: Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**(1-2): 299-306, 2000.
- Stoka V., Turk B., Schendel S.L., Kim T.H., Cirman T., Snipas S.J., Ellerby L.M., Bredesen D., Freeze H., Abrahamson M., Bromme D., Krajewski S., Reed J.C., Yin X.M., Turk V., Salvesen G.S.: Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J. Biol. Chem.* **276**(5): 3149-3157, 2001.
- Stone A.A, Chambers T.C.: Microtubule inhibitors elicit differential effects on MAP kinase (JNK, ERK, and p38) signaling pathways in human KB-3 carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **254**(1): 110-119, 2000.
- Stumm S., Meyer A., Lindner M., Bastert G., Wallwiener D., Guckel B.: Paclitaxel treatment of breast cancer cell lines modulates Fas/Fas ligand expression and induces apoptosis which can be inhibited through the CD40 receptor. *Oncology* **66**(2): 101-111, 2004.
- Sutherland R., Delia D., Schneider C., Newman R., Kemshead J., Greaves M.: Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**(7): 4515-4519, 1981.
- Takimoto R., El-Deiry W.S.: Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene* **19**(14): 1735-1743, 2000.
- Talapatra S., Thompson C.B.: Growth factor signaling in cell survival: implications for cancer treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**(3): 873-878, 2001.
- Tan K.H., Hunziker W.: Compartmentalization of Fas and Fas ligand may prevent auto- or paracrine apoptosis in epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **284**(2): 283-290, 2003.

- Tardy C., Codogno P., Autefage H., Levade T., Andrieu-Abadie N.: Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle). *Biochim. Biophys. Acta* **1765**(2): 101-125, 2006.
- Timmer J.C., Salvesen G.S.: Caspase substrates. *Cell Death Differ.* **14**(1): 66-72, 2007.
- Tinel A., Tschopp J.: The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* **304**(5672): 843-846, 2004.
- Tomita Y., Marchenko N., Erster S., Nemaierova A., Dehner A., Klein C., Pan H., Kessler H., Pancoska P., Moll U.M.: WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J. Biol. Chem.* **281**(13): 8600-8606, 2006.
- Trapani J.A., Sutton V.R.: Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr. Opin. Immunol.* **15**(5): 533-543, 2003.
- Triesscheijn M., Baas P., Schellens J.H., Stewart F.A.: Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist* **11**(9): 1034-1044, 2006.
- Truksa J., Kovar J., Valenta T., Ehrlichova M., Polak J., Naumann P.W.: Iron deprivation induces apoptosis independently of p53 in human and murine tumour cells. *Cell Prolif.* **36**(4): 199-213, 2003.
- Tsujimoto Y., Shimizu S.: Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ. Suppl 2*: 1528-1534, 2005.
- Turner J., Koumenis C., Kute T.E., Planalp R.P., Brechbiel M.W., Beardsley D., Cody B., Brown K.D., Torti F.M., Torti S.V.: Tachpyridine, a metal chelator, induces G2 cell-cycle arrest, activates checkpoint kinases, and sensitizes cells to ionizing radiation. *Blood* **106**(9): 3191-3199, 2005.
- Vaishampayan U., Parchment R.E., Jasti B.R., Hussain M.: Taxanes: an overview of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Urology* **54**(6A Suppl): 22-29, 1999.
- Vancompernelle K., Van Herreweghe F., Pynaert G., Van de Craen M., De Vos K., Totty N., Sterling A., Fiers W., Vandenabeele P., Grooten J.: Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett.* **438**(3): 150-158, 1998.
- Vermeulen K., Van Bockstaele D.R., Berneman Z.N.: Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann. Hematol.* **84**(10): 627-639, 2005.
- Vulpe C.D., Kuo Y.M., Murphy T.L., Cowley L., Askwith C., Libina N., Gitschier J., Anderson G.J.: Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat. Genet.* **21**(2): 195-199, 1999.
- Walle T., Walle U.K., Kumar G.N., Bhalla K.N.: Taxol metabolism and disposition in cancer patients. *Drug Metab. Dispos.* **23**(4): 506-512, 1995.
- Wang T.H., Wang H.S., Soong Y.K.: Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* **88**(11): 2619-2628, 2000.
- Wang Y., Cabral F.: Paclitaxel resistance in cells with reduced beta-tubulin. *Biochim. Biophys. Acta* **1744**(2): 245-255, 2005.
- Wei J., Sun Z., Chen Q., Gu J.: Serum deprivation induced apoptosis in macrophage is mediated by autocrine secretion of type I IFNs. *Apoptosis* **11**(4): 545-554, 2006.
- Werner A.B., de Vries E., Tait S.W., Bontjer I., Borst J.: Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. *J. Biol. Chem.* **277**(25): 22781-22788, 2002.

- Willis S.N., Fletcher J.I., Kaufmann T., van Delft M.F., Chen L., Czabotar P.E., Ierino H., Lee E.F., Fairlie W.D., Bouillet P., Strasser A., Kluck R.M., Adams J.M., Huang D.C.: Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* **315**(5813): 856-859, 2007.
- Woodburn K.W., Vardaxis N.J., Hill J.S., Kaye A.H., Phillips D.R.: Subcellular localization of porphyrins using confocal laser scanning microscopy. *Photochem. Photobiol.* **54**(5): 725-732, 1991.
- Yanase S., Nomura J., Matsumura Y., Nagai K., Kinoshita M., Nakanishi H., Ohnishi Y., Tokuda T., Tagawa T.: Enhancement of the effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy by simultaneous hyperthermia. *Int. J. Oncol.* **27**(1): 193-201, 2005.
- Yanase S., Nomura J., Matsumura Y., Nagata T., Fuji T., Tagawa T.: Synergistic interaction of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy with simultaneous hyperthermia in an osteosarcoma tumor model. *Int. J. Oncol.* **29**(2): 365-373, 2006.
- Yin L., Stearns R., Gonzalez-Flecha B.: Lysosomal and mitochondrial pathways in H₂O₂-induced apoptosis of alveolar type II cells. *J. Cell. Biochem.* **94**(3): 433-445, 2005.
- Yin X.M.: Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* **369**: 7-19, 2006.
- Yokota T., Ikeda H., Inokuchi T., Sano K., Koji T.: Enhanced cell death in NR-S1 tumor by photodynamic therapy: possible involvement of Fas and Fas ligand system. *Lasers Surg. Med.* **26**(5): 449-460, 2000.
- Yu L., Lenardo M.J., Baehrecke E.H.: Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell Cycle* **3**(9): 1124-1126, 2004.
- Yuan J., Lovejoy D.B., Richardson D.R.: Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment. *Blood* **104**(5): 1450-1458, 2004.
- Zhao J., Kim J.E., Reed E., Li Q.Q.: Molecular mechanism of antitumor activity of taxanes in lung cancer (Review). *Int. J. Oncol.* **27**(1): 247-256, 2005.
- Zhao M., Brunk U.T., Eaton J.W.: Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A₂. *FEBS Lett.* **509**(3): 399-404, 2001.
- Zhao R., Planalp R.P., Ma R., Greene B.T., Jones B.T., Brechbiel M.W., Torti F.M., Torti S.V.: Role of zinc and iron chelation in apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer chelator. *Biochem. Pharmacol.* **67**: 1677-1688, 2004.
- Zhou Y., Wang Q., Mark Evers B., Chung D.H.: Oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis is mediated by p38 MAPK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**(4): 860-865, 2006.
- Zhuang S., Kochevar I.E.: Ultraviolet A radiation induces rapid apoptosis of human leukemia cells by Fas ligand-independent activation of the Fas death pathways. *Photochem. Photobiol.* **78**(1): 61-67, 2003.

VII. Konferenční příspěvky

VII.1. Přednášky

Kovář J., **Koc M.**, Truksa J., Ehrlichová M., Nad'ová Z.: Apoptosis induced by iron deprivation in B lymphomas. European Iron Club Meeting 2006, Barcelona, Spain, 2006.

Ehrlichová M., **Koc M.**, Kovář J.: Cell death induced by classical taxanes and novel taxane in sensitive and resistant breast cancer cells. 27th Meeting of the European Cell Proliferation Society, London, United Kingdom, 2005. *Cell Prolif.* **38**: 313-341, 2005.

Koc M., Nad'ová Z., Kovář J.: Iron deprivation induces cell death in human Raji cells independently of mitochondrial pathway. 27th Meeting of the European Cell Proliferation Society, London, United Kingdom, 2005. *Cell Prolif.* **38**: 313-341, 2005.

Kovář J., **Koc M.**, Truksa J. and Nad'ová Z.: Caspase-3 can be activated without cytochrome c release during apoptosis induction in tumor cells. 27th Meeting of the European Cell Proliferation Society, London, United Kingdom, 2005. *Cell Prolif.* **38**: 313-341, 2005.

Kovář J., **Koc M.**, Truksa J., Nad'ová Z. and Ehrlichova M.: Apoptosis induced by iron deprivation in tumor cells. BioIron 2005, Prague, Czech Republic, 2005.

Kovář J., **Koc M.**, Nad'ová Z., Ehrlichová M.: Apoptosis induced by iron deprivation in tumor cells. 26th Meeting of the European Study Group for Cell Proliferation, Prague, Czech Republic, 2004. *Cell Prolif.* **37**: 128, 2004.

VII.2. Plakátové sdělení

Kovář J., **Koc M.**, Truksa J., Ehrlichová M., Nad'ová Z.: Apoptosis induced by iron deprivation in tumor cells. 14th Euroconference on Apoptosis, Chia, Italy, 2006.

Koc M., Nad'ová Z., Kovář J.: Alternative mechanisms of apoptosis induction by iron deprivation in tumor cells. BioIron 2005, Prague, Czech Republic, 2005.

Koc M., Truksa J., Nad'ová Z. and Kovář J.: Apoptosis induced by iron deprivation in tumor cells. Konference mladých chemiků, biochemiků a molekulárních biologů 2005, Devět Skal: Žďárské vrchy, Czech Republic, 2005. *Chem. Listy* **99**: 70, 2005.

Koc M., Nad'ová Z., Kovář J.: Iron deprivation induces cell death in human Raji cells independently of mitochondrial pathway. 13th Euroconference on Apoptosis, Budapest, Hungary, 2005.

Kovář J., Štýbrová H., Novák P., Ehrlichová M., Truksa J., **Koc M.**, Scheiber-Mojdekar Barbara and Goldenberg H.: HSP90 recognized as an iron-binding protein associated with the plasma membrane. BioIron 2005, Prague, Czech Republic, 2005.

Koc M., Nad'ová Z., Truksa J., Kovář J.: Iron deprivation induces apoptosis via differing mechanisms in human and mouse tumor cells. 26th Meeting of the European Study Group for Cell Proliferation, Prague, Czech Republic, 2004. *Cell Prolif.* **37**: 128, 2004.