

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Úloha kaspázy 2 v indukci apoptózy nádorových
buněk**

Martina Schmiedlová

Školitel: Prof. RNDr. Jan Kovář, DrSc.

Praha 2010

Děkuji svému školiteli Prof. RNDr. Janu Kovářovi, DrSc. za odborné konzultace a trpělivost. Zároveň bych chtěla poděkovat svému příteli Michalu Doležalovi za podporu při psaní bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama z uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha 2010

Martina Schmiedlová

Obsah

1. Seznam zkratk	4
2. Abstrakt	6
2. Abstract	7
3. Úvod	8
4. Apoptóza	9
4.1. Vnější dráha indukce apoptózy	9
4.2. Vnitřní dráha indukce apoptózy a úloha mitochondrií v této dráze	10
4.3. Regulace indukce apoptózy	11
4.4. Exekuce apoptózy	11
5. Úloha kaspáz v indukcii apoptózy	12
5.1. Iniciační a exekuční kaspázy	12
5.1.1. Iniciační kaspázy	13
5.1.2. Exekuční kaspázy	13
5.2. Komplexy aktivující kaspázy	13
6. Kaspáza 2: aktivace a funkce	14
6.1. Exprese kaspázy 2	14
6.2. Aktivace kaspázy 2	16
6.3. Substráty kaspázy 2	17
6.4. Funkce kaspázy 2	18
7. Indukce apoptózy u nádorových buněk	19
7.1. Nádorové buňky a možnosti terapie nádorových onemocnění	19
7.2. Mechanismy indukce apoptózy u nádorových buněk	20
7.2.1. Induktory apoptózy v terapii nádorových onemocnění	20
7.3. Rezistence k indukcii apoptózy u nádorových buněk	21
7.3.1. Příčiny vzniku rezistence k indukcii apoptózy u nádorových buněk	21
7.3.2. Možnosti překonání rezistence k indukcii apoptózy u nádorových buněk	22
8. Kaspáza 2 a indukce apoptózy nádorových buněk	23
8.1. Uplatnění kaspázy 2 v mechanismech indukce apoptózy u nádorových buněk	24
8.2. Uplatnění kaspázy 2 v terapii nádorových onemocnění	25
9. Závěr	26
10. Použitá literatura	27

1. Seznam zkratek

ABC transporter	ATP-binding cassette transporter
AIF	Apoptosis-inducing factor
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM and Rad3-related
Bax	Bcl-2-associated X
Bcl-2	B-cell chronic lymphocytic leukemia 2
BIR	Baculovirus IAP repeat
Bid/tBid	BH3-interacting domain death agonist/truncated Bid
CAD	Caspase-activated deoxyribonuclease
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CAMK2	Ca and calmodulin dependent kinase 2
Chk-1	Checkpoint kinase 1
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DIABLO	Direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein with low pI
DISC	Death inducing signalling complex
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinases
FADD	Fas-associated death domain
FasL	Fas ligand
FasR	Fas receptor
FLIP	FLICE-inhibitory protein
IAP	Inhibitor apoptosis protein
ICAD	Inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAP	Microtubule-associated protein
MDR	Multi drug resistance
NFκB	Nuclear factor kappa B
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase
PIDD	p53-inducible death domain-containing protein

PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKB	Protein kinase B
PKCK2	Protein kinase CK2
RAIDD	RIP associated Ich-1/CED homologous protein with death domain
RBM5	RNA-binding motif protein 5
Rb protein	Retinoblastoma protein
RIP	Receptor Interacting Protein
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspases
SUMO	Small ubiquitine-like modifier
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRADD	TNF receptor associated death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
XIAP	X-linked IAP

2. Abstrakt

Kaspáza 2 v rámci buňky pravděpodobně plní několik funkcí. Kaspáza 2 má schopnost podílet se na indukci apoptózy, dále pak schopnost podílet se na reparaci poškozené DNA či regulaci buněčného cyklu. Kaspáza 2 má znaky iniciačních i exekučních kaspáz. Podnětem pro aktivaci kaspázy 2 bývá mimo jiné oxidační stres a poškození DNA buňky. Kaspáza 2 je aktivována štěpením při interakci s proteinovými komplexy. Jeden z proteinových komplexů tvoří prokaspáza 2 s proteiny RAIDD a PIDD, čímž vznikne PIDDozóm, v jehož rámci se prokaspáza 2 aktivuje. Aktivní kaspáza 2 existuje ve dvou formách a to v krátké S formě a dlouhé L formě. Dlouhá L forma působí proapoptoticky na rozdíl od S formy, která má antiapoptotické účinky. S forma kaspázy 2 byla zatím prokázána pouze na úrovni mRNA, nikoli na úrovni proteinu. Hlavní úloha L formy kaspázy 2 spočívá v indukci apoptózy u normálních i nádorových buněk. Kaspáza 2 se v nádorových buňkách aktivuje vnější i vnitřní dráhou indukce apoptózy. Indukce apoptózy kaspázou 2 se např. studuje v souvislosti s terapií nádorů prsu taxany. Schopnost kaspázy 2 indukovat apoptózu u nádorových buněk i v nepřítomnosti proteinu p53 se využívá v terapii nádorů včetně překonání rezistence k indukci apoptózy, která je podmíněná ztrátou aktivity proteinu p53. Kaspáza 2 se účastní indukce apoptózy různými mechanismy v závislosti na typu buněk. Přesné mechanismy, kterými je kaspáza 2 aktivována, a přesné mechanismy, kterými kaspáza 2 indukuje apoptózu, však nejsou zatím zcela objasněny.

Klíčová slova: apoptóza, kaspáza 2, PIDDozóm, indukce apoptózy, nádorové buňky

2. Abstract

Within the cell, caspase-2 probably fulfills several functions. Caspase-2 can be involved in apoptosis induction, DNA repair as well as cell cycle regulation. Caspase-2 has the character of both initiator and executioner caspase. A stimulus for caspase-2 activation can be oxidative stress or DNA damage. Caspase-2 is activated by cleavage during an interaction with protein complexes. One of protein complexes, i.e. PIDDosome, is made of protein PIDD, RAIDD and pro-caspase-2. Within the PIDDosome, caspase-2 is activated. Activated caspase-2 occurs in a short S form and in a long L form. L form of caspase-2 has proapoptotic effects and S form of caspase-2 has antiapoptotic effects. Caspase-2S has been only detected on mRNA level but not on protein level. The main role of caspase-2L is apoptosis induction in normal and tumor cells. Caspase-2 in tumor cells is activated by extrinsic as well as intrinsic apoptotic pathway. Apoptosis induction by caspase-2 is for example studied in connection with breast cancer treatment with taxanes. Caspase-2 ability of apoptosis induction in cancer cells independently of p53 protein is employed in cancer treatment, including overcoming the resistance to apoptosis induction which is based on losing p53 activity. Caspase-2 is involved in apoptosis induction by different mechanisms depending on the type of cell. Precise mechanisms, by which caspase-2 is activated, and precise mechanisms, by which caspase-2 induces apoptosis, remain unknown till now.

Key words: apoptosis, caspase-2, PIDDosome, apoptosis induction, cancer cell

3. Úvod

Vznik nádorové buňky je dlouhodobý, až desetiletí trvající několikastupňový proces. Tento proces indukují kancerogeny, tj. látky či agens, které jsou schopné vyvolat proces transformace normální buňky v buňku nádorovou. Mezi kancerogeny patří některé chemické látky (např. aromatické uhlovodíky), některé typy záření (např. UV záření) a také některé viry (např. retroviry a papilomaviry). Nádorové buňky mají narušené mechanismy zajišťování tkáňové homeostáze. Znamená to, že buď nadměrně proliferují a nebo mají nedostatečnou schopnost realizovat apoptózu. Nádorové buňky pak mohou proliferovat na nepřislušných místech v organismu a bez příslušného stimulačního signálu. Svoji invazivitou mohou destruovat okolní tkáň a také mohou tvořit metastáze v různých částech organismu.

Pro léčbu nádorových onemocnění má velký význam pochopení mechanismů indukce a realizace apoptózy. V indukci i realizaci apoptózy mají důležitou roli proteázy kaspázy, které štěpením substrátů smrti v buňce nakonec způsobí její zánik. Indukce apoptózy se účastní iniciační kaspázy a exekuční fázi apoptózy realizují kaspázy exekuční. Kaspáza 2 je jedna z prvních objevených, ale nejméně prostudovaných kaspáz. Tato kaspáza obsahuje CARD doménu, což je typické pro iniciační kaspázy. Na druhé straně ale své substráty štěpí mechanismem, který využívají kaspázy exekuční. Až nedávné studie odhalily uplatnění kaspázy 2 nejen v indukci apoptózy, ale také v regulaci buněčného cyklu i při reparaci poškozené DNA. V posledních letech se badatelé také zabývají možnou úlohou kaspázy 2 v terapii nádorových onemocnění. Přítomnost kaspázy 2 v některých typech nádorových buněk je důležitá pro indukci apoptózy a tedy i pro léčbu příslušných nádorových onemocnění. Navzdory těmto poznatkům zůstává přesný mechanismus fungování kaspázy 2 u nádorových buněk nejasný.

Ve své bakalářské práci jsem se proto zaměřila na nejnovější poznatky, které se týkají mechanismu aktivace kaspázy 2, lokalizace kaspázy 2 v buňce a na úlohu kaspázy 2 v mechanismech indukce apoptózy u nádorových buněk. Nově získané poznatky o úloze kaspázy 2 v indukci apoptózy se začínají již využívat při studiu možností terapie nádorových onemocnění.

4. Apoptóza

Apoptóza je jedna z forem programované buněčné smrti. Tento geneticky řízený a evolučně konzervovaný proces, je např. významný pro normální průběh ontogeneze a pro udržování tkáňové homeostázy.

Mezi charakteristické znaky indukce apoptózy patří mimo jiné fragmentace jaderné DNA, aktivace proteáz kaspáz a expozice fosfatidylserinu na vnější stranu plazmatické membrány (Hengartner, 2000). Indukce apoptózy je závislá na aktivaci kaspáz, které nakonec štěpí specifické buněčné substráty, známé jako substráty smrti. To pak vede k exekuci apoptózy (Samali et.al., 1999). V exekuční fázi apoptózy dochází k postupně navazujícím změnám včetně kondenzace jaderného chromatinu. Tyto změny vedou k rozpadu buňky na apoptotická tělíška, která obsahují části buněčných organel obalených plazmatickou membránou zanikající buňky. Tato apoptotická tělíška jsou po té odstraněna fagocytujícími buňkami (Jacobson et al., 1997), přičemž nedochází k zánětlivé reakci v okolí.

Apoptóza je indukována endogenními apoptotickými signály, mezi které patří aktivovaný protein p53, produkce ceramidu nebo ROS (reactive oxygen species). Exogenními apoptotickými signály jsou příslušné apoptotické signální molekuly. Protein p53 indukuje apoptózu prostřednictvím regulace exprese genů bcl-2 rodiny a Fas genu. Mezi dráhy indukce apoptózy patří vnější dráha, která je zprostředkována ligandy a receptory smrti, a vnitřní mitochondriální dráha. Ve vnější i vnitřní mitochondriální dráze indukce apoptózy jsou aktivovány kaspázy.

Na rozdíl od apoptózy je nekróza patologický a na energii nezávislý proces, který je charakteristický zvětšováním organel včetně mitochondrií v důsledku porušení osmotické rovnováhy. Důsledkem ztráty integrity plazmatické membrány je pak její prasknutí a vylití buněčného obsahu do okolí. Okolní buňky mohou být poškozeny vylitými enzymy a v okolní buněčné tkáni proto dochází k zánětlivé reakci.

4.1. Vnější dráha indukce apoptózy

Vnější dráha indukce apoptózy je zprostředkována interakcemi příslušných ligandů s membránovými receptory, tzv. receptory smrti, které jsou členy rodiny TNF receptorových

proteinů (Locksley et al., 2001). TNF receptory mají extracelulární domény bohaté na cystein a intracelulární doménu smrti tvořenou přibližně 80 aminokyselinami (Ashkenazi & Dixit, 1998). Nejlépe prozkoumanými páry ligand/receptor jsou FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 a Apo2L/DR5 (Ashkenazi et al., 1998). Např. Fas ligand interaguje s Fas receptorem a signál je dále předáván prostřednictvím asociovaného proteinu FADD, který aktivuje kaspázy 8 a 10. Protein TRADD asociovaný s TNFR1 prostřednictvím FADD proteinu také aktivuje kaspázy 8 a 10. Aktivní kaspáza 8 potom aktivuje exekuční kaspázy. Kaspáza 2 může být aktivována vnější drahou indukce apoptózy. Signál je z TNFR1 receptoru předán asociací receptoru s proteiny TRADD, RIP a RAIDD. Kaspáza 2 interaguje s proteinem RAIDD a tím se RAIDD podílí na aktivaci kaspázy 2 (Hsu et al., 1995; Wajant, 2002).

4.2. Vnitřní dráha indukce apoptózy a úloha mitochondrií v této dráze

Klíčovou událostí vnitřní dráhy indukce apoptózy je permeabilizace mitochondriální membrány. K tomu dochází po příslušných stimulech na základě vzniku Bax/Bax kanálů a PT (permeability transition) kanálů. PT kanály jsou tvořené VDAC proteinem ve vnější a ANT proteinem ve vnitřní mitochondriální membráně. Permeabilizace mitochondriální membrány je příčinou zhroucení membránového potenciálu na mitochondriální membráně (Saelens et al., 2004). Z mitochondrií se následně uvolňuje cytochrom c, SMAC/DIABLO, AIF, endonukleáza G a proteáza HtrA2/Omi (Du et al., 2000). Uvolněný cytochrom c, SMAC/DIABLO a HtrA2/Omi aktivují dráhu indukce apoptózy zprostředkovanou kaspázami. V cytoplazmě se cytochrom c váže na protein Apaf-1 a prokaspázu 9, čímž vytvoří apoptozóm. V rámci apoptozómu se aktivuje kaspáza 9. Protein AIF se translokuje do jádra, kde způsobí fragmentaci DNA (Joza et al., 2001). Endonukleáza G také působí v jádře, kde tvoří oligonukleozomální fragmenty DNA (Li et al., 2001).

Vnitřní a vnější dráha indukce apoptózy nejsou striktně oddělené mechanismy realizace buněčné smrti, což dokazuje protein Bid, člen rodiny Bcl-2. Kaspáza 8, která je aktivovaná vnější drahou indukce apoptózy, štěpí protein Bid na tBid, který se po té účastní vnitřní dráhy indukce apoptózy (Li et al., 1998).

4.3. Regulace indukce apoptózy

Proteiny z rodiny IAP regulují indukci apoptózy vnější i vnitřní drahou. Členové této rodiny proteinů se liší mimo jiné počtem tzv. BIR domén. Jednou BIR doménou je tvořen Survivin, tři tandemově uspořádané BIR domény a jiné domény mají proteiny XIAP, HIAP1, HIAP2 a další. Hlavním mechanismem regulace indukce apoptózy je zde inhibice aktivované kaspázy 3 a kaspázy 7. Schopnost přímé inhibice kaspáz byla však prokázána pouze u proteinu XIAP (Eckelman & Salvesen, 2006).

Významnými regulátory vnitřní dráhy indukce apoptózy jsou proteiny z rodiny Bcl-2. Tyto proteiny jsou charakteristické přítomností BH (Bcl-2 homology) domén. Většina členů této rodiny obsahuje také TM (transmembrane) doménu. Mezi proteiny působící antiapoptoticky patří Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bfl-1 a Mcl-1. Proapoptotický účinek mají proteiny Bax, Bcl-x_S, Bak, Bad, Bid a Bim. Proteiny Bcl-2 rodiny tvoří prostřednictvím svých BH domén homodimery či heterodimery. Vzájemný poměr mezi proapoptotickými a antiapoptotickými proteiny této rodiny je rozhodující pro odpověď buňky na apoptotický signál. V regulaci indukce apoptózy zprostředkované proteiny z Bcl-2 rodiny má velký význam ovlivnění průchodnosti mitochondriální membrány pro cytochrom c a další molekuly vytvořením Bax/Bax kanálů.

Vnější dráha indukce apoptózy zprostředkovaná dráhou receptorů smrti může být inhibována proteinem FLIP. Protein FLIP obsahuje dvě DED domény, které interagují s DED doménou proteinu FADD. Důsledkem je blokování aktivace kaspázy 8 proteinem FADD (Scaffidi, 1999).

4.4. Exekuce apoptózy

Na vnější a vnitřní dráhu indukce apoptózy navazuje exekuční fáze. Kaspáza 3, kaspáza 6 a kaspáza 7 mají funkci exekučních kaspáz. Ty štěpí substráty smrti jako jsou např. ICAD, PARP, cytokeratiny, α -fodrin, jaderný protein NuMA či Rb protein. Štěpení substrátů smrti způsobí morfologické a biochemické změny pozorované v apoptotických buňkách (Slee et al., 2001). Kaspáza 3 je považovaná za nejdůležitější exekuční kaspázu. V proliferujících buňkách je endonukleáza CAD v komplexu se svým inhibítozem ICAD. V apoptotických buňkách aktivovaná kaspáza 3 štěpí ICAD a tím se uvolní CAD (Sakahira et al., 1998). Takto

aktivovaná CAD po té realizuje fragmentaci DNA. Kaspáza 3 také štěpí protein Gelsonin, který se váže k aktinu, čímž indukuje reorganizaci cytoskeletu a rozpad buňky na apoptotická tělíčka (Kothakota et al., 1997).

Poslední fází apoptózy je fagocytóza apoptotických tělísek. Přesun fosfatidylserinu z vnitřní na vnější stranu plazmatické membrány je signálem pro okolní buňky, že mají zahájit fagocytózu apoptotických tělísek.

5. Úloha kaspáz v indukci apoptózy

Kaspázy se uplatňují v indukci i exekuci apoptózy. Název kaspáza (caspase) vychází z faktu, že se jedná o cysteinovou proteázu, která štěpí své substráty za zbytkem asparátatu (Alnemri et al., 1996). U *Caenorhabditis elegans*, byl objeven gen *ced-3* kódující proteázu, která se účastní mechanismů programované buněčné smrti. Proteáza *Ced-3* je sekvenčně podobná savčí kaspáze 1. To bylo impulzem pro pochopení mechanismů indukce a exekuce apoptózy u savců včetně lidí (Yuan et al., 1993).

První objevenou kaspázou u savců je kaspáza 1 (Cerreti et al., 1992). Od té doby bylo objeveno 14 různých savčích kaspáz, z toho 10 u lidí (Shi, 2002). První objevená savčí kaspáza, kaspáza 1, má význam společně s kaspázou 4 a 5 v regulaci zánětlivé odpovědi buňky (Cerreti, et al., 1992). Kaspázy 3, 6, 7, 8, 9 a 10 mají důležitou úlohu v indukci a exekuci apoptózy (Shi, 2002). Fyziologická funkce kaspáz 2, 12 a 14 je málo objasněná.

5.1. Iniciační a exekuční kaspázy

Do skupiny iniciačních kaspáz patří kaspázy 8, 9 a kaspáza 10. Mezi exekuční kaspázy se řadí kaspáza 3, 6 a kaspáza 7. Není zcela jasné, zda je kaspáza 2 iniciační či exekuční kaspázou. Iniciační kaspázy obsahují DED domény nebo CARD domény. Iniciační kaspázy jsou syntetizovány jako inaktivní monomery a po jejich aktivaci v multiproteinových komplexech se spustí dráha indukce apoptózy (Alnemri et al., 1996). Exekuční kaspázy obsahují krátkou prodoménu a jsou aktivovány iniciačními kaspázami, které oddělí velkou

p20 a malou p10 podjednotku. Tyto podjednotky interagují a vytvoří kaspázový oligomer (Adams & Cory, 2002).

5.1.1. Iniciační kaspázy

Kaspáza 9 je klíčová ve vnitřní dráze indukce apoptózy. Je aktivována v multiproteinovém komplexu apoptozómu tvořeném Apaf-1, cytochromem c a prokaspázou 9. Aktivovaná kaspáza 9 následně štěpí exekuční kaspázu 3.

Kaspáza 8 má nezastupitelnou úlohu ve vnější dráze indukce apoptózy (Baldin et al., 1996). Kaspáza 10 se skládá ze dvou DED domén jako kaspáza 8, nicméně její funkce v indukci apoptózy není zcela jasná. Z některých výzkumů vyplývá, že se možná funkce lidské kaspázy 10 překrývá v indukci apoptózy s funkcí kaspázy 8 (Kischel et al., 2004). Nedávno se zjistilo, že kaspáza 10 a kaspáza 8 jsou nepostradatelné v zánětlivé reakci zprostředkované NF κ B v antivirové signalizaci (Takahusthi et al., 2006).

Kaspáza 2 sdílí 55% sekvenční homologii s Ced-3 *Caenorhabditis elegans* a obsahuje CARD doménu, která umožňuje dimerizaci molekul prokaspázy 2. K její aktivaci napomáhá také proteinový komplex PIDDosom, jehož je součástí. Podrobnější informace o kaspáze 2 a její funkci budou popsány v následujících kapitolách.

5.1.2. Exekuční kaspázy

Kaspáza 3 je klíčovou exekuční kaspázou, která štěpí příslušné buněčné substráty v apoptotických buňkách (Porter & Janicke, 1999). Je aktivována štěpením iniciačními kaspázami 8 a 9, ale nikoli kaspázou 2 (Degterev et al., 2003).

Kaspázu 7 pravděpodobně aktivuje kaspáza 3 (Cohen, 1997). Kaspáza 7 je velmi podobná kaspáze 3 a má s ní podobnou substrátovou specifitu. Štěpí tetrapeptidové substráty, obsahující ideálně DEVD sekvenci, mezi které patří například PARP, DNA dependentní proteinkinázy, ribonukleoprotein U1 nebo huntingtin (Thornberry et al., 1997).

Aktivátorem kaspázy 6 je kaspáza 3 (Cohen, 1997). Kaspáza 6 je strukturně podobná kaspáze 3 a 7, avšak má jinou substrátovou specifitu, štěpí lamin A (Thornberry et al, 1997).

5.2. Komplexy aktivující kaspázy

Aktivace iniciačních kaspáz vyžaduje mimo jiné jejich interakce s adaptorovými

komplexy. Kaspáza 2 se aktivuje v PIDDozomu (Tinel & Tschopp 2004), kaspáza 8 v komplexu DISC (Kischkel et al., 1995) a kaspáza 9 interaguje v rámci apoptozómu (Zou et al., 1999).

PIDDozóm: Zformováním tohoto proteinového komplexu z dílčích proteinů včetně prokaspázy 2 dojde následně k autokatalytickému štěpení kaspázy 2 a tím se kaspáza 2 aktivuje. Podrobnější informace jsou popsány níže v kapitole 6.2.

DISC: Ve vnější dráze indukce apoptózy asociuje s receptory s doménou smrti adaptorový protein FADD, který je jedním ze zprostředkovatelů signálu k indukci apoptózy. S prokaspázou 8 tvoří FADD proteinový komplex DISC. Proteinový komplex DISC usnadňuje aktivaci kaspázy 8 indukcí její dimerizace. Z některých studií vyplývá, že se DISC podílí i na aktivaci kaspázy 10 (Peter & Krammer, 2003).

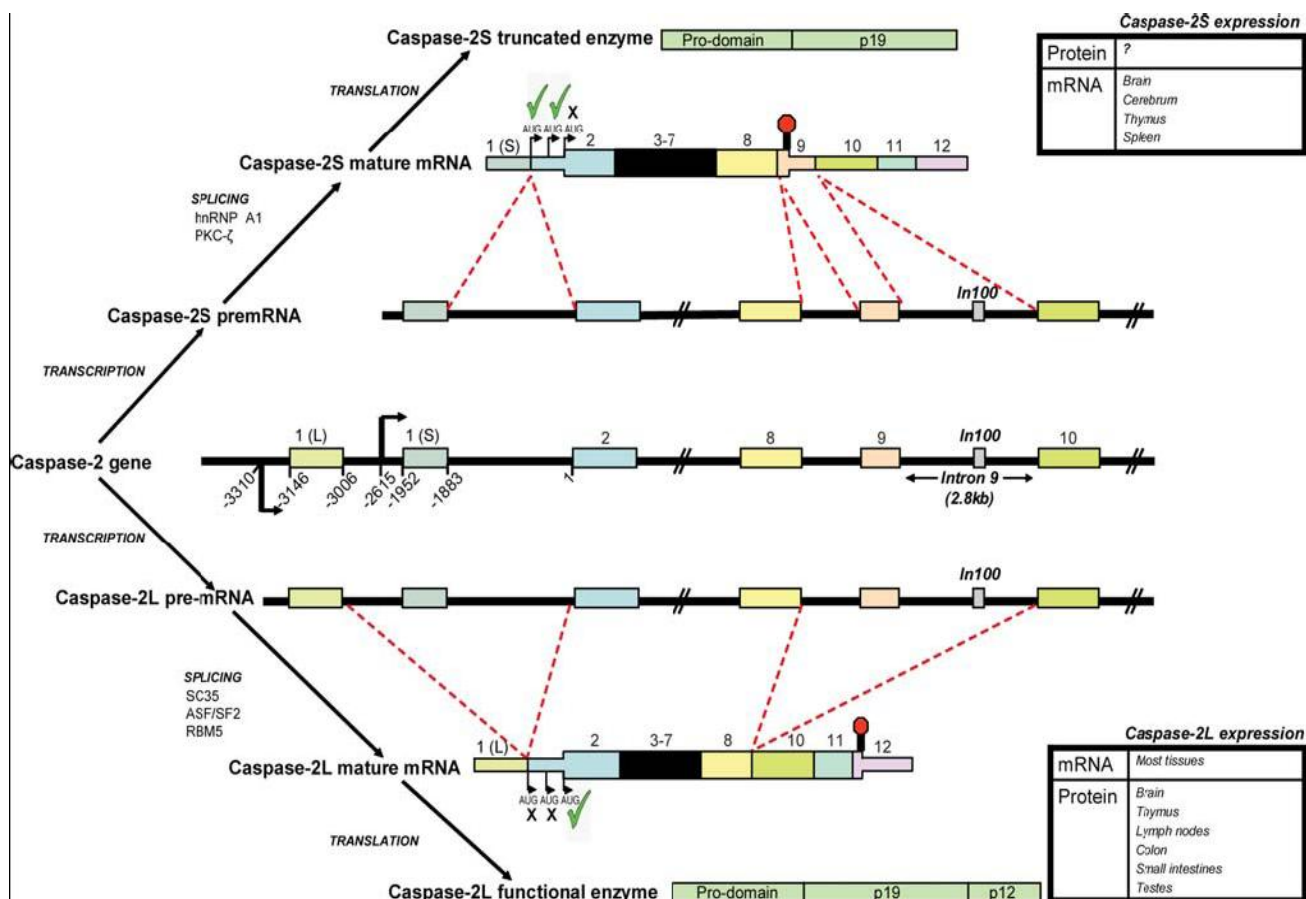
Apoptozóm: Kaspáza 9 je nejlépe prostudovanou iniciační kaspázou a její aktivace je zprostředkována apoptozómem, tj. multimerním komplexem tvořeným Apaf-1, cytochromem c a prokaspázou 9. Apaf-1 je v buňce v inaktivované formě. K aktivaci je nutná interakce Apaf-1 s cytochromem c za přítomnosti dATP (Li et al., 1997). V apoptozómu interaguje CARD doména Apaf-1 s CARD doménou prokaspázy 9, čímž se kaspáza 9 aktivuje (Li et al., 1997).

6. Kaspáza 2: aktivace a funkce

V buňce se kaspáza 2 nachází v Golgiho aparátu, endoplazmatickém retikulu, v jádře a mitochondriích (Colussi et al., 1998; Reilly et al. 2002). Přítomnost kaspázy 2 byla prokázána i v cytosolu nervových buněk (Troy et al., 1997).

6.1. Exprese kaspázy 2

Z genu pro kaspázu 2 jsou přepisovány dvě formy RNA a to pro kaspázu 2L a kaspázu 2S (Obr. 1) Iniciace transkripce L formy začíná na promotoru 3310 nukleotidů před druhým exonem a iniciace transkripce S formy začíná 1952 nukleotidů před druhým exonem.



Obr. 1. Expresí forem kaspázy 2L a kaspázy 2S. V genu pro kaspázu 2 dochází k vystřížení intronů, čímž vznikají dvě formy prokaspázy 2 – S a L. V konečné fázi kratší S forma kaspázy 2 neobsahuje p12 doménu, na rozdíl od delší L formy kaspázy 2. Převzato z Kitevska et al., 2009.

S forma mRNA prokaspázy 2 obsahuje exon 9, který kóduje stopkodon, což vede k translaci budoucího 2S proteinu bez malé podjednotky p12. L forma mRNA obsahuje element In 100 v intronu 10, který zabrání začlenění exonu 9. Tím je přeskočen stopkodon v exonu 9 a 2L forma kaspázy 2 je tedy delší (Cote et al., 2001). Translací 2L transkriptu potom vznikne protein obsahující velkou p19 podjednotku i malou p12 podjednotku. Expresí L-mRNA převažuje nad expresí S-mRNA. Kaspáza 2L indukuje buněčnou smrt, zatímco kaspáza 2S inhibuje indukci apoptózy (Wang et al., 1994).

Jedním z inhibitorů transkripce kaspázy 2 je BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) (Hermel et al., 2004). Proteiny p53 a p73 mohou inhibovat expresi mRNA kaspázy 2. Jiné studie však uvádí, že p73 může naopak stimulovat expresi S formy kaspázy 2 (Toh et al., 2008).

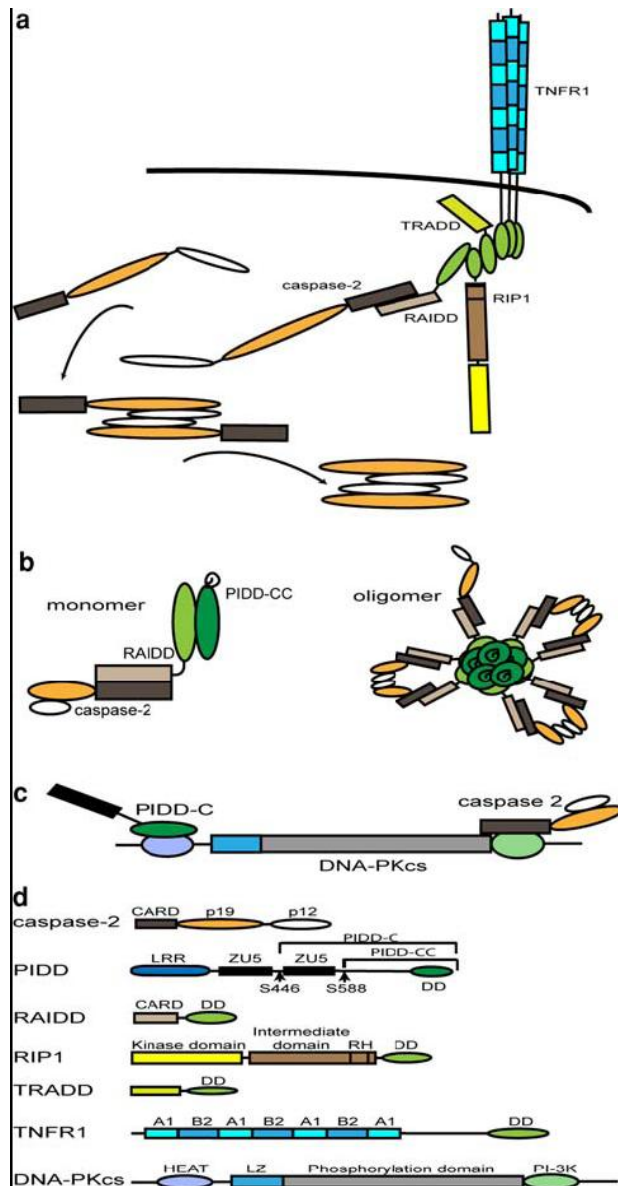
Kaspáza 2 je posttranslačně modifikovaná fosforylací, která napomáhá její aktivaci (Shi et al., 2009; Nutt et al., 2005).

6.2. Aktivace kaspázy 2

Aktivaci kaspázy 2 ovlivňuje posttranslačně několik proteinů. Jedním z nich je SUMO a enzym 9. Spojením enzymu 9 se SUMO se formuje Ubc-9. Protein SUMO se váže ke CARD doméně prokaspázy 2. Ovlivňuje se tak jaderná lokalizace a aktivace prokaspázy 2

(Krumnschnabel et al., 2009).

Kaspáza 2 je aktivována na základě interakcí s proteinovými komplexy, které stimulují autokatalytické štěpení kaspázy 2. Jednou z možností je aktivace na základě signálu od TNFR1 předávaného vnější dráhou indukce apoptózy. Na základě interakce DED domén adaptorového proteinu TRADD s proteinem RIP 1 dojde k interakci RIP 1 s prokaspázou 2, která je v komplexu s proteinem RAIDD. Protein RAIDD a prokaspáza 2 spolu interagují prostřednictvím svých CARD domén. Následně se odštěpí dimer podjednotek p19 a p12 částečně aktivované kaspázy 2. Ke konečné aktivaci kaspázy 2 dochází pravděpodobně ještě v dalších krocích (Duan & Dixit, 1997; Stanger et al., 1995).



Obr. 2. Proteinové komplexy, které se podílejí na aktivaci kaspázy 2. (a) Proteinový komplex TNFR1, TRADD, RAIDD, RIP1, a prokaspázy 2 pravděpodobně aktivuje kaspázu 2. (b) V proteinovém komplexu tzv. PIDDozómu interaguje prokaspáza 2 s RAIDD proteinem prostřednictvím jejich CARD domén a protein RAIDD interaguje s proteinem PIDD prostřednictvím DD domén. Tento proteinový komplex je tvořen sedmi dimery prokaspázy 2 a RAIDD proteinu, které se spojují s pěti molekulami PIDDu a tak vytvoří PIDDozóm. (c) Dalším proteinovým komplexem, který obsahuje protein PIDD je komplex složený z DNA dependentní protein kinázy (DNA-PKcs), PIDDu a prokaspázy 2. (d) Komponenty které tvoří proteinové komplexy s prokaspázou 2: PIDD, RAIDD, RIP1, TRADD, TNFR1 a DNA dependentní proteinkináza. Převzato z Kitevska et al., 2009.

Toto je tzv. dráha kaspázy 2- RAIDD-RIP1-TRADD-TNFR1 proteinů (Obr. 2a).

K aktivaci kaspázy 2 může docházet v rámci proteinového komplexu o molekulové hmotnosti cca 670 kDa známého jako PIDDozóm (Tinel & Tschopp, 1995). PIDDozóm, tvoří protein PIDD, RAIDD a prokaspáza 2. (Tinel & Tschopp, 1995). Pro úspěšné zformování PIDDozómu je nutná interakce mezi CARD doménami kaspázy 2 a proteinem RAIDD (Tinel & Tschopp 2004). Alternativním sestřihem a postranlačními úpravami vznikají různé formy PIDD proteinu (Cuenin et al., 2007). Z toho vyplývá, že existuje i více forem PIDDozómu (Tinnel & Tchopp 2004) (Obr. 2b, c). Z krystalografických analýz vyplývá, že prostřednictvím svých DD interaguje sedm RAIDD s pěti PIDD a se sedmi prokaspázami 2, čímž se tvoří PIDDozóm (Obr. 2b). Molekulární mechanismus, kterým PIDDozóm zprostředkovává aktivaci kaspázy 2, zůstává neobjasněný.

DNA-PKcs-PIDDozóm (Obr. 2c) je komplex, kde spolu interagují DNA dependentní serin-threoninkináza, PIDD a prokaspáza 2. Aktivace kaspázy 2 tímto komplexem nevede k indukci apoptózy, ale k zablokování buněk v G2 fáze a reparaci DNA (Shi et al., 2009).

6.3. Substráty kaspázy 2

Kaspáza 2 je specifická proteáza, která štěpí své substráty za aspartátovým zbytkem proteinu (Alnemri et al., 1996). Jedním ze známých substrátů kaspázy 2 je Golgin-160. Golgin-160 má specifické místo, kde jej štěpí pouze kaspáza 2. Některé zdroje uvádějí, že štěpení Golginu-2 kaspázou 2 má souvislost s fragmentací golgiho aparátu v průběhu apoptózy. Golgin-160 je sice štěpen kaspázou 2, ale s třikrát vyšší aktivitou jej štěpí i kaspáza 3 (Mancini et al., 2000).

Protein Bid z rodiny Bcl-2 je štěpen *in vitro* také kaspázou 2 (Yuan et al., 1993; Werner et al., 2004). Přesun zkrácené formy tBid do mitochondrií způsobí změnu permeability mitochondriální membrány a následně vylití cytochromu c, AIF a dalších molekul (Yin, 2006). Názor, že kaspáza 2 štěpí Bid *in vivo* vychází z pozorování, kdy byl Bid aktivován před vylitím cytochromu c a kdy byla indukce apoptózy v těchto buňkách inhibována po inhibici kaspázy 2 (Droin et al., 2001). Z jiných studií ale vyplývá, že permeabilita vnější mitochondriální membrány je nezávislá na štěpení proteinu Bid a že kaspáza 2 přímo působí na neznámé proteiny či lipidy v membráně (Robertson et al., 2004).

Dalším substrátem kaspázy 2 je α II-spektrin (Rotter et al., 2004). Štěpení α II-spektrinu kaspázou 2L v průběhu apoptózy vede k destabilizaci buněčného cytoskeletu. Krátká S-forma kaspázy 2 tuto schopnost nemá. Vzhledem k tomu, že kromě kaspázy 2 a 3 štěpí α II-spektrin i exekuční kaspáza 7, můžeme se domnívat, že kaspáza 2 má také exekuční funkci (Zhivotovsky et al., 2005).

Huntingtin je důležitým substrátem kaspázy 2. Různé studie dokazují, že štěpení huntingtinu zprostředkované kaspázou 2 indukuje neurodegenerativní změny buněk. Huntingtin je specificky štěpen také kaspázami 3, 6, 7 a 8. Je možné, že kaspáza 2 působí synergicky s kaspázou 6, kdy každá z kaspáz štěpí huntingtin v jiném místě (Hermel et al., 2004).

Důležitým substrátem kaspázy 2 je ICAD (Sakahira et al., 1998). Původně byl ICAD popsán jako substrát kaspázy 3. Nedávno se však prokázalo, že po působení kaspázy 2 na HeLa buňky, došlo ke štěpení ICAD a k následné indukci fragmentace DNA (Dahal et al., 2007).

Substrátem kaspázy 2 je také cytoskeletární protein desmoplakin (Aho, 2004). Dalšími substráty jsou PARP-1, Bad, PKC δ , HDAC4 a β II-spektrin (Zhivotovsky & Orrenius, 2005).

6.4. Funkce kaspázy 2

Kaspáza 2 obsahuje CARD doménu, která interaguje s adaptorovými proteiny, což je typické pro iniciační kaspázy. Kaspáza 2 štěpí a tím aktivuje kaspázu 7, což ale bylo prokázáno pouze u kvasinek, nikoli u savčích buněk. Tato schopnost ji také řadí mezi iniciační kaspázy (Ho et al., 2005). Další studie přisuzují kaspáze 2 iniciační funkci, protože má důležitou úlohu v indukci apoptózy vyvolané stresem či poškozením DNA. Apoptóza zprostředkovaná kaspázou 2 probíhá vnitřní mitochondriální drahou. Aktivace kaspázy 2 je vyžadována pro translokaci Bax proteinu do mitochondrií a také pro vylití cytochromu c, Smac/Diablo a dalších proteinů z mitochondrií.

Z jiných studií však vyplývá, že se kaspáza 2 chová jako exekuční kaspáza, protože je štěpena kaspázami 3 a 8. Podle specifického způsobu štěpení lze řadit kaspázu 2 mezi exekuční kaspázy. Z výše uvedeného vyplývá, že kaspáza 2 má znaky jak iniciačních, tak i exekučních kaspáz.

Kaspáza 2 se uplatňuje i v regulaci buněčného cyklu. V buňkách, kterým chybí kaspáza 2 případně v buňkách s deregulovanou DNA dependentní proteinkinázou, dochází k částečné poruše G2/M kontrolního bodu buněčného cyklu (Shi et al., 2009). Kaspáza 2 se tak pravděpodobně uplatňuje v G2/M kontrolním bodě buněčného cyklu. Někteří autoři se domnívají, že se kaspáza 2 podílí svou činností také na reparaci DNA. Zatím nebyl objeven konkrétní mechanismus, kterým by se kaspáza 2 na reparaci DNA účastnila (Vakifahmetoglu-Norberg & Zhivotovsky, 2010).

Ze studií vyplývá, že kaspáza 2 působí také jako tumor supresorový protein. Její ztráta vede ke zvýšení onkogenního potenciálu buněk *in vivo* i *in vitro*. Důsledkem ztráty kaspázy 2 je rezistence k indukci apoptózy na základě poškození DNA. U buněk indukovaných gama zářením byla tato rezistence silně posílena inhibicí Chk-1 (Ho et al., 2009). Kaspáza 2 je zde aktivovaná nezávisle na vnitřní mitochondriální dráze indukce apoptózy (Sidi et al., 2008).

7. Indukce apoptózy u nádorových buněk

Indukce apoptózy u nádorových buněk je jedním z možných mechanismů terapie nádorových onemocnění. Apoptózu u nádorových buněk indukuje mimo jiné zablokování buňky v některé fázi buněčného cyklu v důsledku poškození DNA či poruch mitózy.

7.1. Nádorové buňky a možnosti terapie nádorových onemocnění

Nádorové buňky jsou vysunuty z tkáňové homeostáze, přičemž mají zvýšenou proliferační aktivitu a nebo sníženou schopnost realizovat apoptózu.

Transformace normální buňky v nádorovou je dlouhodobý a několikastupňový proces, většinou v důsledku působení kancerogenních faktorů, které mají mutagenní účinky. V nádorových buňkách se v důsledku mutací proto-onkogeny mění v onkogeny a tumor supresorové geny ztrácejí svou funkci.

V současné době se terapie nádorových onemocnění omezuje na tři metody: chirurgickou léčbu, léčbu ozařováním a medikamentózní léčbu tj. chemoterapii. Chemoterapie pomocí cytostatik se zaměřuje na potlačení proliferace nádorových buněk a v konečném důsledku na indukci apoptózy u těchto buněk. Mezi hlavní skupiny cytostatik patří:

1) Látky, které inhibují biosyntézu DNA a jsou strukturně podobné přirozeným metabolitům. Nazývají se analoga či antimetabolity. Mohou blokovat dílčí metabolické mechanismy a nebo jsou nejprve samy metabolicky přeměněny a v této formě inkorporovány do DNA. Podle úrovně, na které působí, se rozeznává několik skupin antimetabolitů. Jsou to analogy kyseliny listové (metotrexát), analogy purinů (merkaptopurin), analogy adeninu (2-deoxykoformycin) a analogy pyrimidinů (5-fluorouracil).

2) Látky, které poškozují strukturu a funkci nukleových kyselin, působí různými mechanismy. Jedná se zejména o alkylaci (cyklofosamid), interkalaci (doxorubicin) či přímé štěpení molekuly DNA (bleomycin). Tento účinek je podobný s působením ionizujícího záření, a proto se označuje jako radiomimetický účinek.

3) Látky poškozující dělicí vřeténko blokují buňky v mitóze. Blokování mitózy způsobují mimo jiné alkaloidy vinblastin, vincristin nebo taxany paclitaxel a docetaxel (Klener, 1994).

7.2. Mechanismy indukce apoptózy u nádorových buněk

K indukci apoptózy může docházet v důsledku interakcí terapeutických látek s DNA. Poškozením DNA se aktivuje protein p53, který indukuje expresi genů rodiny Bcl-2 či Fas, které regulují indukci apoptózy. Jedním z proteinů rodiny Bcl-2, které jsou syntetizovány na základě působení p53, je Bid protein. Na regulaci jeho působení v indukci apoptózy se podílí i kaspáza 2. Další možností indukce apoptózy je interakce terapeutických látek s mitotickým vřeténkem, čímž se inhibuje mitóza a dochází k indukci apoptózy mechanismem mitotické katastrofy.

7.2.1. Induktory apoptózy v terapii nádorových onemocnění

Jedním typem induktorů apoptózy v terapii nádorových onemocnění jsou látky, které inhibují dynamiku mikrotubulů dělicího vřeténka, čímž blokují přechod mezi metafází

a anafázi a ve svém důsledku indukují apoptózu. Do skupiny látek stabilizujících mikrotubuly patří taxany (paklitaxel, docetaxel), epothilon A a B, discodermolid a eleutherobin. Tyto látky se váží k polymernímu tubulinu a brání tak jeho depolymeraci (Zhou & Giannakakou, 2005; Jiang et al., 2006). Druhou skupinou látek zacílených na inhibici dynamiky mikrotubulů jsou vinca alkaloidy (vincristin, vinblastin), kolchicin, podophyllotoxin a nocodazol. Tyto látky se vážou na podjednotky mikrotubulů a brání tak polymeraci mikrotubulů (Jordan & Wilson, 2004). Zablokovaná mitóza působením těchto látek vede k navození procesu známého jako mitotická katastrofa. Mitotická katastrofa potom navozuje indukci apoptózy. V procesu mitotické katastrofy je kaspáza 2 aktivována při přechodu mezi metafází a anafází v důsledku poškození DNA. Aktivovaná kaspáza 2 indukuje uvolnění cytochromu c z mitochondrií a tím aktivaci kaspázy 9 a následně aktivaci kaspázy 3 (Castedo et al., 2004).

7.3. Rezistence k indukci apoptózy u nádorových buněk

Rezistenci k indukci apoptózy mohou navozovat mutace v proteinech, které regulují indukci apoptózy (p53, Bcl-2). Dále je to zvýšená exprese proteinů, které jsou inhibitory apoptózy (Bcl-2, IAP) či exprese proteinů, které zajišťují transport terapeutických látek z buňky a tím zamezí jejich účinku na nádorovou buňku (ABC přenašeče). Překonání rezistence je základním předpokladem pro úspěšnou terapii nádorů.

7.3.1. Příčiny vzniku rezistence k indukci apoptózy u nádorových buněk

Mutace p53 se vyskytují u více než poloviny lidských nádorů. Protein p53 je transkripčním faktorem, který reguluje buněčný cyklus a také indukci apoptózy. Exprese Bax a pravděpodobně i Bcl-2 je regulována proteinem p53. Nádorové buňky mohou získat rezistenci k indukci apoptózy díky zvýšené expresi antiapoptoticky působících proteinů rodiny Bcl-2 a nebo naopak na základě inaktivujících mutací proapoptotických proteinů této rodiny (např. Bax).

Exprese nefunkčních kaspáz, například kaspázy 3 a kaspázy 8, vede k zablokování indukce apoptózy a vzniku rezistence. (Fulda et al., 2001; Janicke et al., 1998). Pokud v buňkách převažuje exprese antiapoptoticky působící S formy kaspázy 2, může být také navozena rezistence k indukci apoptózy. Přítomnost S formy kaspázy 2 byla zatím prokázána pouze na úrovni mRNA.

Proteiny IAP efektivně inhibují apoptózu a tím navozují rezistenci k indukci apoptózy. Protein XIAP je přímým inhibitorem kaspáz. Jiné proteiny z rodiny IAP kaspázy sice váží, ale pravděpodobně neinhibují (Eckelman & Salvesen, 2006).

Rezistence k širokému spektru chemoterapeutických látek u nádorových buněčných linií a lidských nádorů se označuje jako MDR (multi drug resistance) (Tsuruo, 1988). MDR je spojená se zvýšeným transportem léčiv z buněk. Tento transport probíhá prostřednictvím ABC transporterů a je závislý na přísunu energie ve formě ATP.

V rezistenci vůči taxanům se uplatňují mutace α a β forem tubulinu nebo zvýšená dynamika mikrotubulů spojená se zvýšenou expresí mutovaných MAP proteinů.

NF κ B je transkripční faktor, který stimuluje proliferaci a inhibuje indukci apoptózy. NF κ B indukuje syntézu antiapoptoticky působících proteinů Bcl-2 a Bcl-x_L nebo proteinu FLIP. NF κ B může být příčinou rezistence k indukci apoptózy i při terapii taxany (Berrieman et al., 2004; Dong et al., 2002; Dumontet & Sikic, 1999).

7.3.2. Možnosti překonání rezistence k indukci apoptózy u nádorových buněk

Mezi potenciální léčiva se mohou řadit malé inhibiční molekuly, které působí proti mechanismům způsobujících rezistenci při indukci apoptózy (obr. 3).

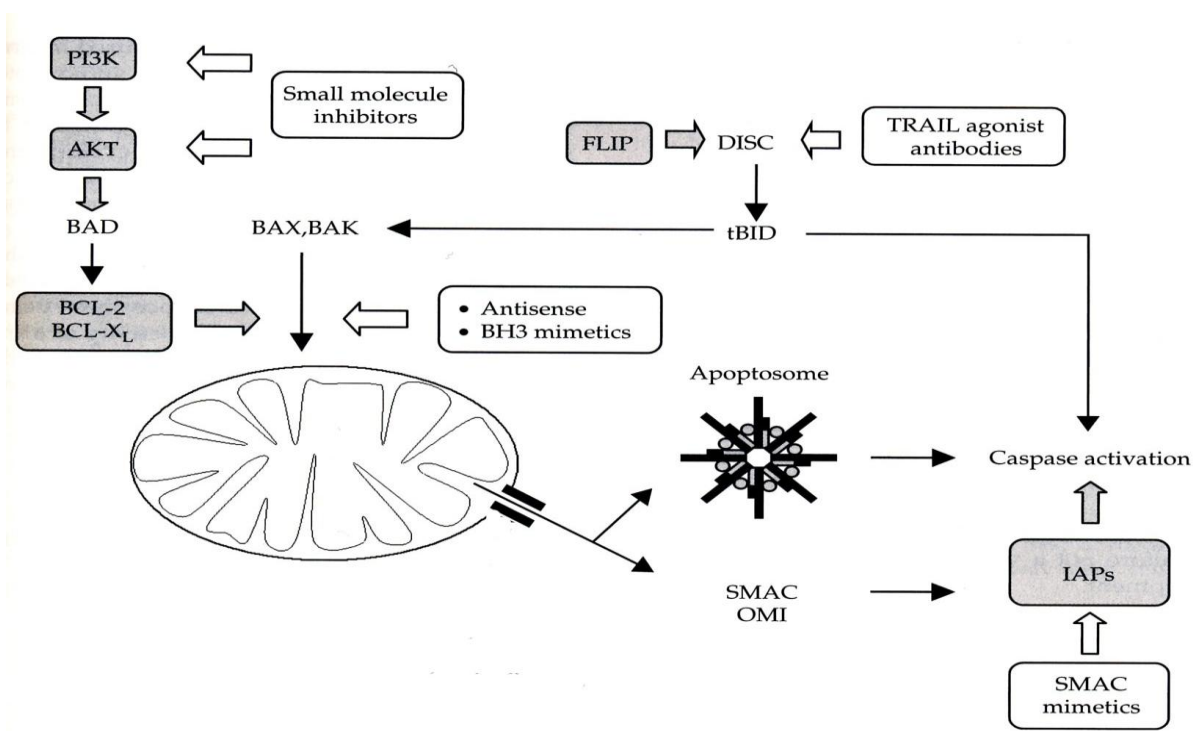
Je známo několik typů látek s potenciálem zvrátit rezistenci k indukci apoptózy u nádorových buněk. Gen pro EGFR (epidermal growth factor receptor) se nachází v mnoha typech nádorových buněk. Produkt tohoto genu spouští fosforylaci PKB (známá jako AKT) zprostředkovanou kinázou PI3K. Současně s aktivací PKB je jako vedlejší efekt inhibován protein Bad, čímž je přerušena indukce apoptózy. Malé inhibitorové molekuly dovedou inhibovat aktivitu PI3K a PKB.

TRAIL receptory jsou funkčně aktivní v mnoha typech nádorových buněk a je na ně zacílen vývoj terapeutických látek. Proti jejich aktivitě působí monoklonální protilátky.

V mnoha typech nádorových buněk dochází k expresi Bcl-2 a Bcl-x_L. Produkty těchto genů inhibují permeabilizaci mitochondriální membrány. Nově objeveným způsobem terapie nádorů je využití antisens nukleotidů, které inhibují aktivitu Bcl-2 a Bcl-x_L. Působení antisens nukleotidů potom napomáhá indukci apoptózy prostřednictvím chemoterapeutických látek (Waters et al., 2000).

Ke tvorbě inhibitorů apoptózy IAPs dochází u většiny nádorových buněk. Následná inhibice těchto proteinů pomocí antisens oligonukleotidů způsobí senzitivitu k apoptóze. IAPs endogenně interagují se svým inhibitorem SMAC proteinem. Malé molekuly „SMAC

mimetics,“ které jsou podobné SMAC proteinům, jsou předmětem současného výzkumu pro jejich uplatnění v klinické praxi.



Obr. 3. Látky s potenciálem zvrátit rezistenci k indukci apoptózy u nádorových buněk. Převzato a upraveno z Knowles & Selby 2005.

8. Kaspáza 2 a indukce apoptózy nádorových buněk

O kaspáze 2 se předpokládá, že se uplatňuje ve vnitřní dráze indukce apoptózy. Ta zahrnuje vytvoření kanálů v mitochondriální membráně a tím uvolnění cytochromu c z mitochondrií, což vede k sestavení apoptozómu, aktivaci kaspázy 9 a následně k aktivaci exekučních kaspáz.

8.1. Uplatnění kaspázy 2 v mechanismech indukce apoptózy u nádorových buněk

Kaspáza 2 je pravděpodobně schopná indukovat apoptózu různými mechanismy v různých typech nádorových buněk.

Kaspáza 2 indukuje apoptózu např. prostřednictvím JNK kinázy. JNK kináza fosforyluje proapoptotický protein Bad nebo se nepřímo účastní štěpení proteinu Bid. Následně dochází k vytvoření kanálů a uvolnění cytochromu c. Tento mechanismus indukce apoptózy byl popsán u nádorových buněk tlustého střeva (Rudolf et al., 2009). U nádorových buněk slinivky se v reakci na volné kyslíkové radikály aktivuje mimo jiné JNK kináza, která aktivuje kaspázu 2. Kaspáza 2 indukuje prostřednictvím proteinů rodiny Bcl-2 permeabilizaci mitochondriální membrány a vnitřní dráhu indukce apoptózy. Další reakcí buňky na oxidační stres je uvolnění katepsinu B z lysozomu do cytoplazmy. Aktivovaný katepsin B aktivuje kaspázu 2 která indukuje změnu membránového potenciálu na mitochondriální membráně a exekuci apoptózy (Yeung et al., 2006).

Působením TNFR1 proteinu je aktivována kaspáza 2, 8 a 9 v nádorových buňkách vaječníků. Na aktivaci kaspázy 2 se podílí proteiny RIP a RAIDD jak bylo popsáno výše (Nakamura et al., 2008).

V nádorových buňkách prostaty je kaspáza 2 aktivovaná PIDDozómem. Kaspáza 2 aktivuje protein Bid a ten indukuje uvolnění cytochromu c z mitochondrií. Kaspáza 2 se tak nepřímo podílí na regulaci aktivace kaspázy 9 (Taghiyev et al., 2006).

V nádorových buňkách se kaspáza 2 uplatňuje v indukci apoptózy vyvolané teplotním šokem nebo genotoxickým stresem. Některé skupiny uvádějí, že kaspáza 2 je aktivována stresem endoplazmatického retikula před uvolněním cytochromu c z mitochondrií. Aktivovaná kaspáza 2 pak zprostředkuje aktivaci kaspázy 9 (Gu et al, 2008). Některé literární údaje, které toto popírají, ukazují, že kaspáza 9 by naopak mohla aktivovat kaspázu 2 (Smaraj et al., 2006).

Dalším mechanismem indukce apoptózy nádorových buněk je dráha odlišná od mitochondriální dráhy i dráhy zprostředkované receptory smrti. Tato ATM/ATR dráha kaspázy 2 se spouští při poškození DNA v buňkách, ve kterých je zároveň oslabená aktivita Chk-1 kinázy. Tato dráha je nezávislá na narušení funkčnosti proteinu p53 a Bcl 2_{xL} (Sidi et al., 2008).

Na základě studia kvasinek byl objeven protein RBM5, který se váže na pre-mRNA kaspázy 2 a ovlivňuje její alternativní sestřih. Protein RBM5 má tumor supresorovou aktivitu. RBM5 se váže na U/C bohatou sekvenci v intronu 9 prokaspázy 2 a reguluje rovnováhu mezi sestřihem prokaspázy 2 na S- a L-formu. To podporuje názor, že RBM5 má úlohu jako regulátor apoptózy v nádorových buňkách (Fushimi et al., 2008).

Interferon (IFN) je považován za jednu z nejúčinnějších látek působících proti melanomu. Zejména IFN- β indukuje apoptózu u melanomových buněk. Testovalo se působení IFN- β na indukci apoptózy a aktivaci kaspáz u různých linií melanomových buněk. Zjistilo se, že aktivace kaspázy 2 je spojená s indukcí apoptózy v buňkách senzitivních na indukci IFN- β (Kamyiat et al., 2010).

Z uvedených případů vyplývá, že kaspáza 2 může být aktivována různými mechanismy v závislosti na způsobu indukce apoptózy či v závislosti na typu mutovaných buněk.

8.2. Uplatnění kaspázy 2 v terapii nádorových onemocnění

Podstatou léčby nádorových onemocnění prostřednictvím chemoterapeutik je indukce apoptózy v příslušných nádorových buňkách. Kaspáza 2 se uplatňuje v různých mechanismech indukce apoptózy včetně mitochondriální dráhy. Kaspáza 2 zde indukuje permeabilizaci mitochondriální membrány, čímž se z mitochondrií uvolní cytochrom c, AIF a další faktory navozující indukci a exekuci apoptózy. Kaspáza 2 může také pomoci překonat rezistenci k indukci apoptózy v důsledku mutací proteinu p53 díky své schopnosti indukovat apoptózu i drahou nezávislou na proteinu p53. Význam kaspázy 2 pro indukci apoptózy nádorových buněk je v současné době zkoumán v souvislosti s terapií taxany či bortezomibem.

9. Závěr

Apoptóza je forma programované buněčné smrti, která společně s proliferací zajišťuje tkáňovou homeostázu. Apoptóza je realizována proteázami kaspázami, které specificky štěpí své substráty známé jako substráty smrti za aspartátem. Kaspáza 2 je jedna z prvních objevených proteáz účastnících se procesu apoptózy. Má největší homologii s Ced-3 *Caenorhabditis elegans*, což vypovídá o tom, že je evolučně značně konzervativní.

Kaspáza 2 na základě alternativního sestřihu tvoří krátkou S formu, která působí antiapoptoticky, a dlouhou L formu, která má proapoptotické účinky. Kaspázu 2 aktivují interakce s různými proteinovými komplexy. PIDDozóm je proteinový komplex, který se skládá z proteinu PIDD, RAIDD a prokaspázy 2. V jiném komplexu je aktivována kaspáza 2 interakcí s proteiny RAIDD, RIP1 a TRADD. Protein TRADD je adaptorovým proteinem TNFR1 receptoru. Kaspáza 2 je aktivována také interakcí s DNA dependentní proteinkinázou a proteinem RIP.

Významnou funkcí kaspázy 2 je schopnost indukovat apoptózu. V indukci apoptózy, u které je stimulem poškození DNA nebo genotoxické stimuly, je kaspáza 2 na počátku indukční dráhy. Členové rodiny p53 mají pravděpodobně důležitou úlohu v iniciaci tohoto procesu. Kaspáza 2 aktivovaná vnější drahou indukce apoptózy štěpí protein Bid na tBid, který následně ovlivňuje permeabilitu vnější mitochondriální membrány. Kaspáza 2 se uplatňuje také při reparaci poškozené DNA či v regulaci buněčného cyklu.

V současné době se vědecké skupiny zabývají možnostmi uplatnění kaspázy 2 v terapii nádorových onemocnění. Schopnost kaspázy 2 indukovat apoptózu nezávisle na přítomnosti proteinu p53 je zde stěžejní, protože mutace v proteinu p53 jsou právě spojovány s transformací buněk. Ze studií vyplývá, že kaspáza 2 se uplatňuje při indukci apoptózy v léčbě nádorových onemocnění například u nádorových buněk prostaty, prsu, kůže nebo u nádorových buněk odvozených z B buněk.

V poslední době byla odhalena řada mechanismů indukce apoptózy, kde se kaspáza 2 nějakým způsobem účastní. Ze studií různých skupin však vyplývá, že přesné mechanismy, kterými se kaspáza 2 podílí na indukci apoptózy nejsou zatím zcela jasné.

10. Použitá literatura

- Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171-171.
- Ashkenazi A., Dixit V.M. (1998). Death receptors: signalling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.
- Baliga B.C., Read S.H., Kumar S. (2004). The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death Differ.* 11: 1234-1241.
- Berrienman H.K., Lind M.J., Cawkkwell L. (2004). Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy? *Lancet. Oncol.* 5: 158-164.
- Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V., Wallach D. (1996). Involvement of MACH, a novel Mort1/FADD-interacting protease, in Fas/APO1- and TNF-receptor induced death. *Cell* 85: 803-815.
- Butt A.J., Harvey N.L., Parasivam G., Kumar S. (1998). Dimerization and autoprocessing of the Nedd-2 (casp-2) precursor requires both the prodomain and the caboxyl-terminal regions. *J. Biol. Chem.* 273: 6763-6768.
- Castedo M., Perfettini J.L., Roumier T., Andreau K., Medema R., Kroemer G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23: 2825-2837.
- Cerreti D.P., Kozlosky C.J., Mosley B., Nelson N., Van Ness K., Greenstreet T.A., March C.J., Kronheim S.R., Druck T., Cannizzaro L.A. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 β converting enzyme. *Science* 256: 97-100.
- Chen H., Chung S., Sukumar S. (2004). HOXA5-induced apoptosis in breast cancer cell is mediated by caspases-2 and -8. *Mol. Cell. Biol.* 2: 924-935.
- Chun H.J., Zheng L., Ahmad M., Wang J., Speirs C.K., Siegel R.M. (2002). Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419: 395-399.
- Cohen G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326: 1-16.
- Das S., Nwachukwu J.C., Li D., Vulin A.I., Martinez-Caballero S., Kinnally K., Samuels H.H. (2007). The nuclear receptor interacting factor-3 transcriptional coregulator mediates rapid apoptosis in breast cancer cells through direct and bystander-mediated events. *Cancer Res.* 67: 1775-1782.
- Degterev A., Boyce M., Yuan J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22: 8543-8567.
- Dong Q.G., Sclabas G.M., Fujioka S., Schmidt C., Peng B., Wu T., Tsao M.S., Evans D.B., Abbruzzese J.L., Mc Donnell T.J., Chia P.J. (2002). The function of multiple I κ B:NF κ B complexes in the resistance of cancer cell to taxol-induced apoptosis. *Oncogene* 21: 6510-6519.

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

Duan H., Dixit V.M. (1997). RAIDD is a new death adaptor molecule. *Nature* 385: 86-89.

Dumontet C., Sikic B.I. (1999). Mechanisms of activation and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport and cell death. *J. Clin. Oncol.* 17: 1061-1070.

Eckelman B.P., Salvesen G.S. (2006). The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J. Biol. Chem.* 281: 3254-3260.

Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50.

Fesik S.W., Shi Y. (2001). Controlling caspases. *Science* 294: 1477-1478.

Fushimi K., Ray P., Kar A., Wang L., Sutherland L.C., Wu J.Y. (2008). Up-regulation of the proapoptotic caspase-2 splicing isoform by a candidate tumor suppressor RBM5. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 41: 15708-15713.

Ghiotto F., Fais F., Bruno S. (2009). BH3-only proteins: The death-puppeteer's wires. *Cytometry* 77: 11-21.

Ho L.H., Tailor R., Dorsyn L., Cakouros D., Bouillet P., Kumar S. (2009). A tumor suppressor function for caspase-2. *Med. Sci.* 13: 5336-5341.

Hermel E., Gafni J., Propp S.S., Leavitt B.R., Wellington C.L., Young J.E. (2004). Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell. Death Differ.* 11: 424-438.

Hsu H., Xiong J., Goeddel D.V. (1995). The TNF receptor1-associated protein TRADD signalling cell death and NFkappa B activation. *Cell* 81: 495-504.

Jiang G., Liu Y.Q., Wei Z.P., Pei D.S., Mao J.L., Zheng J.N. (2010). Enhanced anti-tumor activity by the combination of conditionally replicating adenovirus mediated interleukin-24 and dacarbazine against melanoma cells via induction of apoptosis. *Cancer Lett.* doi: 10.1016/j.canlet.2010.02.003.

Jiang N., Wang X., Yang Y., Dai W. (2006). Advances in mitotic inhibitors for cancer treatment. *Mini-Rev. Med. Chem.* 6: 885-895.

Jordan M.A., Wilson L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* 4: 253-265.

Joza N., Susin S.A., Daugas E., Stanford W.L., Cho S.K., Li C.Y., Sasaki T., Elia A.J., Cheng H.Y., Ravagan L., Ferri K.F., Zamzami N., Wakeham R., Hakem R., Yoshida H., Kong Y.Y., Mak T.W., Zuniga-Pflucker J.C., Kroemer G., Penniger J.M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410: 549-554.

- Kamyiat T., Okabayashi T., Yokota S.I., Kan Y., Ogino J., Yamashita T., Fujii N., Jimbow K. (2010). Increased caspase-2 activity is associated with induction of apoptosis in IFN-beta sensitive melanoma cell lines. *J. Int. Cytokine Res.* doi: 10.1089/jir.2009.0015.
- Kaufmann S.H., Earnshaw W.C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell. Res.* 256: 42-49.
- Kelekar A., Thompson C.B. (1998). Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell. Biol.* 8: 324-330.
- Kitevska T., Spencer D.M.S., Hawkins C.J. (2009). Caspase-2: controversial killer or checkpoint controller? *Apoptosis* 14: 829-848.
- Klener P. (1994). Úspěšnost léčby nádorových onemocnění cytostatiky. *Vesmír* 73: 205.
- Knowles M., Selby P. (2006). Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Oxford University Press, Oxford, p. 225
- Kothakota S., Azuma T., Reinhard C., Klippel A., Tang J., Chu K., McGarry T.J., Kirschner M.W., Kohts K., Kwiatkowski D.J., Williams L.T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278: 294-298.
- Krumshnabel G., Manzl C., Villunger A. (2009). Caspase-2-killer, savior and safeguard-emerging versatile roles for an ill-defined caspase. *Oncogene* 28: 3093-3096.
- Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J. (1998). Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501.
- Li L.Y., Luo X., Wang X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-99.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X. (1997). Cytochrom-c and dATP-dependent formation of Apaf1/procaspase-9 complex initiates the apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
- Locksley R.M., Killeen N., Leonardo M.J. (2001). TNF and TNF receptor superfamilies : interacting mammalian biology. *Cell* 104: 487-501.
- Mhaidat N.M., Wang Y., Kiejda K.A., Zhang X.D., Persey P. (2007). Docetaxel-induced apoptosis in melanoma cell is dependent on activation of caspase-2. *Mol. Cancer Ther.* 6: 752-761.
- Martinet W., Knaapen M.W.M., De Meyer G.R.Y., Herman A.G., Kockx M.M. (2003). Overexpression of the anti-apoptotic caspase-2 short isoform in macrophage-derived foam cells of human atherosclerotic plaques. *Am. J. Pathol.* 3: 731-736.
- Nakamura K., Takamoto, N., Hongo A., Kodama J., Abrzua F., Nasu Y., Kumon H., Hiramatsu Y. (2008). Secretory leukoprotease inhibitor inhibits cell growth through apoptotic pathway on ovarian cancer. *Oncol. Rep.* 19: 1085-1091.

- Nutt L.K., Margolis S.S., Jensen M., Herman C.E., Dunphy W.G., Rathmell J.C., Kornbluth S. (2005). Metabolic regulation of oocyte cell death through the CaMKII-mediated phosphorylation of caspase-2. *Cell* 123: 89-103.
- Pchilchenkov A. (2004). Caspases: potential targets for regulating cell death., *J. Cell Mol. Med.* 8: 432-444.
- Pucci S., Bonnano E., Pichiorri F., Angeloni C., Spagnoli L.G. (2004). Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene* 23: 2298-2304.
- Rizzuto R., Pinton P., Carrington W., Fay F.S., Fogarty K.E., Lifshitz L.M., Tuft R.A., Pozzan T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280: 1763-1766.
- Rudolf E., Andělová H., Červinka M. (2009) Activation of several concurrent proapoptotic pathways by sulforaphane in human colon cancer cells SW620. *Food and Chemical Toxicology* 47: 2366-2373.
- Saelens X., Festjens N., Vande Walle L., van Gurp M., van Loo G., Vandenabeele P. (2004). Toxic protein released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23: 2861-2874.
- Sakahira H., Enari M., Nagata S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99.
- Scaffidi C., Schmitz I., Kammer P.H., Peter M.E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *Nature* 274: 1541-1548.
- Scorrano L., Oakes S.A., Opferman J.T., Cheng E.H., Sorcinelli M.D., Pozzan T., Korsmeyer S.J. (2003). BAX and BAK regulation of the endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300: 135-139.
- Shariat S.F., Desai S., Song W. (2001). Adenovirus-mediated transfer of inducible caspases. A novel death switch gene therapeutic approach to prostate cancer. *Cancer Res.* 61: 2562-2571.
- Shi M., Vivian C.J., Lee K.J., Ge C., Morotomi-Yano K., Manzl C., Bock F., Sato S., Tomomori-Sato C., Zhu R., Haug J.S., Swanson S.K., Washburn M.P., Chen D.J., Chen B.P., Villunger A., Florens L., Du C. (2009). DNA-PKcs-PIDDosome: a nuclear caspase-2-activating complex with role in G2/M checkpoint maintenance. *Cell* 136: 508-520.
- Shi Y. (2002). Mechanisms of caspase inhibition and activation during apoptosis. *Mol. Cell* 9: 459-470.
- Sidi S., Sanda T., Kennedy R.D., Hagen A.T., Jette C.A., Hoffmans R. Pascual J., Imamura S., Kishi S., Amatruda J.F., Kanki J.P., Green D.R., D'Andrea A.A., Look A.T. (2008). Chk1 suppresses a caspase-2 apoptotic response to DNA damage that bypasses p53, Bcl-2 and caspase-3. *Cell* 133: 864-877.
- Stanger B.Z., Leder P., Lee T.H., Kim E., Seed B. (1995). RIP-a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/Apo-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81:

513-523.

Taghiyev A.F., Guseva N.V., Glover R.A., Rokhlin O.W., Cohen M.B. (2006). TSA-induced cell death in prostate cancer cell lines is caspase-2 dependent and involves the PIDDosome. *Cancer Biol. Ther.* 5: 1199-1205.

Takahashi K., Kakai T., Kumar H., Sato S., Yonehara S., Akira S. (2006). Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J. Immunol.* 176: 4520-4524.

Thornberry N.A., Rano T.A., Peterson E.P., Rasper D.M., Timkey T., Garcia-Calvo M. Houtzager V.M., Nordstrom P.A., Roy S., Vaillancourt J.P., Chapman K.T., Nicholson D.W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 17907-17911.

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

Tsuruo T. (1988). Mechanisms of multidrug resistance and implications for therapy. *Jpn. J. Cancer Res.* 79: 285-296.

Wajant H. (2002). The Fas signalling pathway: more than a paradigm. *Science* 296: 1635-1636.

Yang X.H., Sladek T.L., Liu X., Hitler B.R., Froelich C.J., Thor A.D. (2001). Reconstruction of caspase-3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res.* 61: 348-354.

Yeung B.H.Y., Huang D.C., Sinicrope F.A. (2006). PS-341 (Bortezomib) induces lysosomal cathepsin B release and a caspase-2-dependent mitochondrial permeabilization and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J. Biol. Chem.* 281: 11923-11932.

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

Zhang R., Humphreys I., Sahu R.P., Shi Y., Srivastava S.K. (2008). In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis* 13: 1465-1478.

Zhivotovsky B., Orrenius S. (2005). Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331: 859-867.

Zhou J., Giannakakou P. (2005). Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 5: 67-71.

