

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Biologie
Studijní program: Imunologie



Bc. Nad' a Hradilová

**Úloha endocytózy a endozomální acidifikace v apoptóze indukované ligandem
TRAIL**

Role of endocytosis and endosomal acidification in TRAIL-induced apoptosis

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Ladislav Anděra, CSc

Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky, v.v.i.
Oddělení buněčné signalizace a apoptózy

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohláším, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Ladislava Anděry CSc. na Ústavu molekulární genetiky AV ČR. v. v. i., a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8.5.2012

Naďa Hradilová

Tato diplomová práce mohla vzniknout díky finanční podpoře z GA ČR (P301-10-1971), the Center of Molecular and Cellular Immunology (1M6837805001), the 6th Framework Program project ONCODEATH a institucionálnímu grantu AV0Z50520514.

Velice děkuji svému školiteli RNDr. Ladislavu Anděrovi, CSc. za laskavost a trpělivost během mých začátků i při psaní diplomové práce. Dále za to, že mi umožnil proniknout do světa vědy a že jsem se na něj kdykoliv mohla obrátit a vždy mi byla poskytnuta rada nebo pomoc. Dále bych chtěla moc poděkovat Vladěce Horové za to, že mě se mnou po prvních týdnech nevyrazila dveře a za velice příjemnou spolupráci. Dále děkuji svému příteli za to, že se mnou během psaní práce nerozešel a pomohl mi zvítězit nad záludnostmi MS wordu. A nakonec velké díky mé rodině za celkovou podporu během studia i v samotném finále.

ABSTRAKT

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) je známý zejména pro svou schopnost selektivně odstraňovat nádorové buňky. Patří mezi ligandy z rodiny TNF (tumor necrosis factor) a po navázání na receptory smrti DR4 nebo DR5 spouští vnější apoptotickou dráhu. Pro úspěšný přenos apoptotického signálu je nezbytné efektivní formování multimerního komplexu DISC (death-inducing signaling complex) a následná aktivace iniciační kaspázy-8. Avšak po čáteční děje vedoucí plné aktivaci kaspáz nejsou zcela objasněny. Jedním z faktorů, které mohou iniciaci vnější receptorové dráhy ovlivnit, je endocytóza komplexu TRAIL-DR4/5-DISC (tzv. receptozom). Recentní studie zabývající se úlohou endocytózy TRAILového receptozomu podávají rozporuplné výsledky. U různých buněčných linií byl pozorován proapoptotický, antiapoptotický nebo dokonce žádný vliv endocytózy receptozomu. V této práci jsme se zaměřili na určení úlohy endocytózy a následné acidifikace TRAIL receptozomů během TRAIEm indukované apoptózy u buněčných linií odvozených od kolorektálního karcinomu. Prokázali jsme se, že na klatrinu závislá endocytóza TRAILových receptozomů a zároveň i endozomální a lyzozomální acidifikace je potřebná pro efektivní aktivaci kaspázy-8 a kaspázy-3 během časně fáze apoptózy. Inhibice endocytózy a acidifikace vedly k poklesu apoptotické signalizace během první hodiny od indukce apoptózy. Tento inhibiční efekt byl pouze přechodný a nedošlo k úplnému zastavení apoptotické signalizace. Inhibice acidifikace pomocí inhibitorů V-ATPázy způsobila také celkové zpomalení apoptotických dějů a změny v organizování receptozomů do endozomálních kompartmentů. Z této studie vyplývá, že endocytóza a acidifikace TRAIL obsahujících receptozomů mají pozitivní vliv na TRAIEm indukovanou apoptotickou signalizaci a celkově urychlují apoptotické děje ve vybraných liniích kolorektálního karcinomu.

Klíčová slova: apoptóza, TRAIL, kaspáza-3, kaspáza-8, receptory smrti, endocytóza, acidifikace

ABSTRACT

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) became known for its ability to selectively eliminate cancer cells. This ligand is a member of the TNF (tumor necrosis factor) ligands family and triggers extrinsic apoptotic pathway by binding of its death receptor 4 or 5 (DR4/5), and subsequent formation of death-inducing signalling complex (DISC). This signalling complex is required for successful transmission of apoptotic signal and activation of proximal caspases. However, regulation of the initial steps leading to activation of caspases is still not fully understood. Endocytosis of a TRAIL- DR4/5-DISC complex can be one of modulators of the initiation of extrinsic apoptotic pathway. Recent studies show controversial data documenting that endocytosis of TRAIL receptors can in cell type specific manner either positively or negatively influence TRAIL-induced apoptotic signalling. In this study, we focus on the analysis of a role of endocytosis and acidification of endosomal compartments during TRAIL-induced apoptosis in human colorectal cancer cell lines. Our results support the view that both clathrin-dependent endocytosis of TRAIL receptor and endosomal acidification positively affect activation of caspases during the early stages of TRAIL-induced apoptosis. Inhibition of endocytosis or endosomal acidification causes significant and reproducible drop of apoptotic signalling in first hour after TRAIL treatment. However, this inhibitory effect is only temporary and it does not lead to full-blown inhibition of apoptosis. Suppression of acidification by V-ATPase inhibitors causes an overall slowdown of apoptotic signaling and disruption of the endosomal trafficking of TRAIL receptors. This study shows that endocytosis and endosomal acidification of TRAIL receptors have positive effect on apoptotic signaling and accelerate the early TRAIL-induced apoptotic events in tested colorectal cell lines.

Key words: apoptosis, TRAIL, death receptors, caspase-3, caspase-8, endocytosis acidification

SEZNAM ZKRATEK

AIF	apoptózu indukující faktor
AMK	aminokyselina
AP2	adaptorový protein 2
Apaf-1	apoptosis protease activating factor-1
Apo1/2	apoptotický antigen 1/2
apod.	a podobně
APS	ammonium persulfát
APRIL	a proliferation-inducing ligand
ARF6	ADP-ribosylation factor 6
ASM	acid sphingomyelinase, kyselá sfingomyelináza
Asp	kyselina asparagová/aspartát
ATP	adenosine triphosphate; adenosintrifosfát
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Baf A1	bafilomycin A1
Bak	Bcl-2 antagonist killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	apoptózu regulující protein objeven u B-cell lymfomu
Bcl-xL	apoptózu regulující protein příbuzný Bcl-2
BH	Bcl-2 homology domain
Bid	BH3-interacting domain death agonist
BSA	bovine serum albumin; hovězí sérový albumin
C 16, 18, 24	ceramid 16, 18, 24
C-terminus	carboxy/COOH terminus/C-konec
CAD	Caspase-activated DNase
CARD	caspase activation and recruitment domain
CCA	concanamycin A
CD	cluster of differentiation; diferenciační skupina
CDC42	cell cycle division 42
cFLIP	cellular FLICE-like inhibitory protein
CHQ	chloroquine
CHC	clathrin heavy chain, těžký řetězec klatrinu
CL	celkový lyzát
CPZ	chlorpromazin
CMV	cytomegalovirus
CTSD	cathepsin D
CUL-3	cullin-based E3 ligase
Da; kDa	Dalton (jednotka molekulární hmotnosti 1Da \approx 1.6605 \times 10 ⁻²⁷ kg); kiloDalton
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DcR	decoy receptor
DD	death domain
DED	death effector domain
DFF40	DNA fragmentation factor 40
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DISC	death-inducing signaling complex
DR	death receptor
DUB A20	deubiquitináza A20
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EEA1	early endosome antigen 1

EndoG	endonukleáza G
EST	expressed sequence tag
Erk	extracellular signal-regulated kinase
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated death domain
FasL	Fas ligand
FBS	fetal bovine serum; fetální hovězí sérum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FLICE	FADD homologous ICE-like protease/caspase-8
FLN	filipin
g	tíhové zrychlení ($\sim 9,8 \text{ m/s}^2$)
GPI	glycosylphosphatidylinositol
HCC	hepatocelulární karcinom
HtrA2	high-temperature requirement factor A2
IAP	inhibitor of apoptosis
IFN- γ	interferon gama
I κ B	inhibitor NF- κ B
IKK	I κ B kináza
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LAMP	Lysosomal-associated membrane protein
LDL	Low-density lipoprotein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	myeloid cell leukemia protein-1
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
MORT-1	mediator of receptor-induced toxicity-1
N-terminus	amino-terminus/NH ₂ -terminus/N-konec
např.	například
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
nSMase	neutrální sfingomyelináza
OPG	osteoprotegerin
p53	transformation-related protein 53
PAO	phenylarsine oxide
PBS	phosphate-buffered saline
PFA	paraformaldehyd
PH	pleckstrin homology
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP _(2,3)	phosphatidylinositol monophosphate/ 4,5-bisphosphate/ 3,4,5-triphosphate
PKB	protein kináza B
Puma	p53-upregulated modulator of apoptosis
RANK	receptor activator of NF- κ B
RANKL	receptor activator of NF- κ B ligand
RBX1	ring-box-1
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RIP	Receptor-interacting protein
ROS	reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	room temperature; pokojová teplota
S1P	sfingosin-1-fosfát

SD	standard deviation, směrodatná odchylka
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering ribonucleic acid
Smac	second mitochondria-derived activator of caspases
SO	sfingosin
tBid	truncated Bid; zkrácená forma proteinu Bid
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
Tf-A594	transferin-Alexa594
tj.	to jest
TLR3	toll-like receptor 3
TNF	tumor necrosis factor
TNF-R1	tumor necrosis factor receptor 1
TNFRSF	tumor necrosis factor receptor superfamily
TRADD	TNFR-associated death domain
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
TRAIL	Tumor-necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand
tzn.	to znamená
tzv.	tak zvaný
V-ATPáza	vakuolární ATPáza
WT	wild typ; buňky nezměněné, neindukované
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT.....	5
SEZNAM ZKRATEK	6
OBSAH.....	9
1. ÚVOD.....	11
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1 Základní dráhy apoptotické signalizace.....	12
2.1.1 Kaspázy – klíčové účastníci apoptotických dějů.....	12
2.1.2 Vnější - receptorová dráha	14
2.1.3 Vnitřní - mitochondriální dráha	14
2.2 TRAIL - apoptotický ligand z rodiny TNF.....	16
2.2.1 Struktura a exprese ligandu TRAIL.....	17
2.2.2 Fyziologická a protinádorová funkce ligandu TRAIL.....	18
2.2.3 Receptory ligandu TRAIL	20
2.2.4 Apoptotická signalizace indukovaná skrze ligand TRAIL	22
2.2.5 Neapoptotické signální dráhy ligandu TRAIL	24
2.3 Základní endocytické dráhy	27
2.3.1 Endocytóza zprostředkovaná klatrinovými váčky.....	27
2.3.2 Na klatrinu nezávislá endocytóza	29
2.3.3 Endozomální a lyzozomální acidifikace	30
2.4 Internalizace receptorů indukujících apoptózu	32
2.4.1 Úloha internalizace receptorů TNF-R1 a FasR.....	32
2.4.2 Endocytóza receptorů DR4, DR5 po stimulaci TRAILem	33
3. CÍLE PRÁCE.....	35
4. METODY A MATERIÁLY	36
4.1 Buněčné linie	36
4.2 Kultivační média.....	36
4.3 Udržování buněčných kultur, rozmrazování, zamrazování buněk.....	36
4.4 Použití chemikálií a značení rekombinantního TRAILu	37
4.5 Detekce a kvantifikace apoptotických buněk pomocí průtokové cytometrie	38
4.5.1 Stanovení aktivity kaspázy-3 použitím protilátky M30-FITC.....	38
4.5.2 Detekce aktivované kaspázy 8	38
4.6 Konfokální mikroskopie	39
4.6.1 Detekce buněčných proteinů a struktur metodou imunofluorescence	39

4.6.2	Lokalizace buněčných kompartmentů pomocí fluorescenčních práb.....	40
4.7	Inhibice endocytózy a acidifikace.....	40
4.8	SDS-PAGE, western blotting, imunodetekce proteinů.....	41
4.9	Precipitace TRAIL-receptor-DISC komplexu	42
4.10	RNA interference	43
4.10.1	Snížení exprese proteinů pomocí siRNA.....	43
4.10.2	Transdukce buněk lentivirovými vektory pro expresi shRNA	44
4.11	Použité roztoky	45
5.	VÝSLEDKY	47
5.1	Analýza endocytózy TRAILem aktivovaných receptozomů.....	47
5.2	Ověření typu endocytické dráhy TRAIL receptozomu.....	49
5.3	Inhibice na dynaminu závislé endocytózy a její vliv na TRAILem indukovanou apoptózu.....	51
5.4	Změny v aktivaci kaspázy-3 vyvolané potlačením acidifikace endozomálních kompartmentů.....	53
5.5	Vliv souběžné inhibice acidifikace a endocytózy na indukci apoptózy	55
5.6	Vliv inhibice acidifikace endozomů na vznik a aktivaci TRAIL-DISC komplexu	56
5.7	Sledování změn v aktivaci kaspázy-8 po inhibici acidifikace	57
5.8	Snížení exprese proteinu cFLIP pomocí shRNA a vliv této změny na indukci apoptózy u buněk s blokací V-ATPázy	58
5.9	Změny lokalizace a seskupování TRAIL receptozomů po inhibici V-ATPázy	60
6.	DISKUZE	63
7.	ZÁVĚR	69
8.	POUŽITÁ LITERATURA	70
9.	DODATKOVÁ DATA.....	79

1. ÚVOD

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je soubor procesů, který zajišťuje u mnohobuněčných živočichů fyziologicky příznivé odstranění nebezpečných, nepotřebných nebo nakažených buněk. Apoptóza je nepostradatelná během embryonálního vývoje, kdy se formují orgánové soustavy a po celý život organismu pomáhá udržovat integritu tkání a celkovou homeostázi. Deregulovaná apoptóza je příčinou široké škály nemocí včetně mnoha malignit (Danial & Korsmeyer, 2004). Aby mohly být cílové buňky odstraněny přirozenou cestou, musí obdržet signál, který indukuje apoptotickou signalizaci. Jednou z možností, jak spustit apoptotické procesy, je vazba ligandu z rodiny TNF na tzv. receptory smrti. Do této rodiny patří i ligand TRAIL, který je známý svou schopností selektivně indukovat apoptózu u nádorových buněk. Pro tuto vlastnost jsou TRAIL a humanizované agonistické protilátky intenzivně klinicky testovány jako možná protinádorová terapeutika. Avšak po prvotních pozitivních výsledcích se ukázalo, že asi 50% nádorů je k TRAILu rezistentních. Protože rezistence mohou mít velice různorodý původ, je i dnes velice těžké jednotlivé rezistence identifikovat a potlačit (Ashkenazi et al., 2008). Jednou z příčin rezistence vůči TRAILu může být narušená endocytóza TRAILu a jeho receptorů (Zhang & Zhang, 2008). Bylo prokázáno, že je TRAIL, stejně jako Fas ligand a TNF α , endocytován bezprostředně po asociaci ligandu s receptorem. Úloha této internalizace TRAILu však není, na rozdíl od TNF α , doposud objasněna. Byly publikovány výsledky ukazující pozitivní roli endocytózy u buněk hepatocelulárního karcinomu, další publikace však tuto dohledku na jiných buněčných liniích nepotvrzují (Akazawa et al., 2009, Kohlhaas et al., 2007, Zhang et al., 2009). Tato diplomová práce se zaměřuje na zjištění úlohy endocytózy TRAILu a jeho receptorů a následných procesů, zejména endozomální acidifikace, během TRAIlem indukované apoptózy. Pro všechny pokusy byly použity k TRAILu citlivé linie odvozené od kolorektálního karcinomu. Naše výsledky mohou přinést zajímavé informace o iniciačních procesech apoptotické signalizace a pomoci vysvětlit děje vedoucí k účinné aktivaci apoptózy nebo naopak k rezistenci.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Základní dráhy apoptotické signalizace

U savců je v principu programovaná buněčná smrt zprostředkovaná skrze dvě dráhy - vnitřní a vnější. Obě vedou k aktivaci specifických cysteinových proteáz zvaných kaspázy a k fyziologické smrti buňky. Tyto dráhy mohou fungovat nezávisle na sobě, ale často se navzájem ovlivňují a amplifikují.

2.1.1 Kaspázy - klíčoví účastníci apoptotických dějů

Kaspázy jsou centrálními aktivátory i vykonavateli programované buněčné smrti v savčích buňkách. Jedná se o rodinu intracelulárních proteáz, které nesou ve svém aktivním místě aminokyselinu cystein. Díky tomuto cysteinu jsou kaspázy schopné štěpit peptidovou vazbu specificky za aspartátem. Kaspázy, účastníci se apoptotické signalizace, můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou kaspázy iniciační (-2, -8, -9 a -10), které zahajují apoptotickou signalizaci po kontaktu s receptory nebo na základě intracelulárních podnětů. Druhou skupinou jsou kaspázy exekuční neboli efektorové (-3, -6 a -7), které jsou štěpeny a tím i aktivovány iniciačními kaspázami či jinými proteázami (např. granzymem B). Exekuční kaspázy následně štěpí mnoho buněčných substrátů, čímž vykonávají vlastní buněčnou smrt (Alnemri et al., 1996, Li & Yuan, 2008).

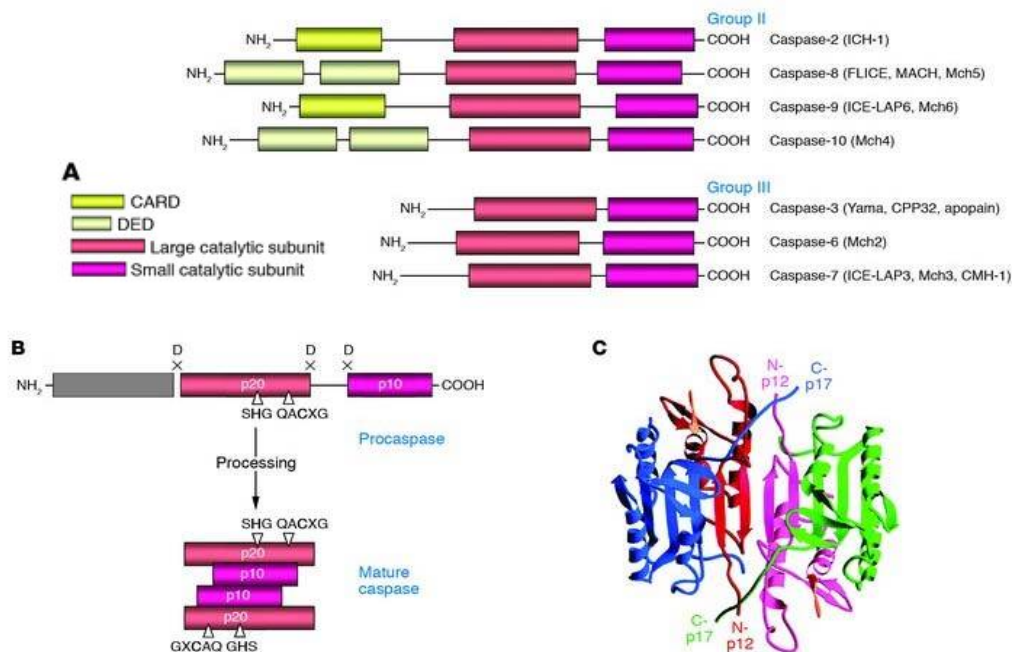
Kaspázy jsou neustále přítomné v buňkách jako neaktivní zymogeny neboli prokaspázy. Až poté, co dojde k jejich štěpení ve specifických zásahových místech, jsou plně aktivovány. Prokaspázy se skládají ze tří částí - NH₂ terminální domény, velké podjednotky (~20 kDa) a malé podjednotky (~10 kDa). Delší N-terminální doména s protein-protein interakčními motivy je znakem iniciačních kaspáz. Exekuční kaspázy mají pouze zkrácenou N-koncovou část, která neobsahuje domény pro interakci. Tyto efektorové interakční domény (DED, CARD) jsou zodpovědné za vazbu iniciačních kaspáz do specifických multimerních komplexů (DISC pro kaspázy-8/-10 nebo apoptozom pro kaspázu-9). Po vazbě do těchto komplexů dochází ke štěpení a aktivaci iniciačních kaspáz. Kaspázy mají dvě štěpná místa, jedno za N-terminální doménou a druhé mezi malou a velkou podjednotkou. Během štěpení kaspáza zcela oddělí svou N-terminální doménu. Malá a velká podjednotka změní konformaci, ale i nadále zůstávají v dimeru (**Obr. 2.1.1**). Aktivní formu tvoří dvě spojené kaspázy, tzn. dvě malé a dvě velké podjednotky a každá z velkých podjednotek nese aktivní proteolytické místo (Denault et al., 2006).

Nezbytnou podmínkou pro aktivaci iniciačních kaspáz je jejich autoaktivace

vzájemným řěpením podjednotek. K této autoaktivaci dochází po kontaktu kaspáz v multimerních iniciačních komplexech (viz níř ka p. 2.1.3, 2.2.3). Každý takovýto iniciační komplex se skládá z ligandu a jeho receptoru, iniciační kaspázy a případně adaptorového proteinu (Riedl & Shi, 2004). Na rozdíl od iniciačních kaspáz, exekuční kaspázy dimerizují samy krátce po té, co jsou syntetizovány a již jako dimer jsou řěpeny iniciačními kaspázami. K jejich aktivaci tedy není nutná vzájemná protein-protein interakce skrze N-terminální doménu.

Aby nedošlo k samovolnému neregulovanému řěpení kaspáz, je jejich aktivita striktně kontrolována. Iniciační kaspázy-8/-10 reguluje specifický inhibitor cFLIP a exekuční kaspázy jsou inhibovány proteiny z rodiny IAP. Pokud v buňce převládnu apoptické signály, inhibitory jsou zablokovány a exekuční kaspázy proteolyticky degradují mnoho různých buněčných substrátů a aktivují další proteiny účastníci se finální destrukce buňky (Riedl & Salvesen, 2007, Pop & Salvesen, 2009).

Kromě výř zmíněných kaspáz existují také kaspázy neapoptické (-1, -4, -5), které jsou aktivní při zánětu a pyroptóze (patogenem indukovaná smrt buňky). Zvlářním řípadem je pak kaspáza-14, účastníci se diferenciaci keratinocytů (Pop & Salvesen, 2009).



Obrázek 2.1.1 Struktura iniciačních a exekučních kaspáz. A) Všchny kaspázy mají tři části - N-koncovou část, prostřední velkou podjednotku a C-koncovou malou podjednotku. Iniciační kaspázy (Group II) nesou na N-konci funkční domény DED (kaspáza-8 a -10) nebo CARD (kaspáza-9 a -2). Tyto domény jsou zodpovědné za seskupování kaspáz, díky kterému dochází k iniciačnímu řěpení. Exekuční kaspázy (Group III) tyto domény postrádají. B) Mezi jednotlivými částmi se nachází místa řěpení, začínající aspartátem. Po aktivačním řěpení dojde k oddělení

N-koncové části. Kaspáza dále existuje ve formě dimeru. Aktivační řezací místa se nacházejí na velké podjednotce. C) 3D struktura kaspázového dimeru. Každá část je formována pomocí hydrofobických interakcí. Znázorněné jsou N- a C-konce každé podjednotky (převzato z Lavrik *et al.*, 2005).

2.1.2 Vnější - receptorová dráha

Vnější apoptotická dráha je iniciována navázáním ligandu na tzv. receptory smrti (death receptors - DRs). Vazba ligandu na tyto receptory způsobí jejich trimerizaci a následnou asociaci s adaptorovými proteiny (FADD, TRADD) a kaspázou-8/-10. Toto uskupení tvoří základ signalizačního komplexu DISC (death inducing signaling complex). Pokud skrze DISC dojde k aktivaci iniciační kaspázy-8, signalizace pokračuje přes exekuční kaspázy až k závěrečné destrukci buňky (**Obr. 2.1.2**) (Feig & Peter, 2007). Tato dráha může být zcela nezávislá a je schopná indukovat zánik buňky bez napojení na vnitřní dráhu. Buňky, u kterých není pro plnou aktivaci apoptózy nezbytné amplifikovat apoptotickou signalizaci pomocí vnitřní mitochondriální dráhy, jsou označovány jako buňky typu I. Vyznačují se velmi účinnou, DISCem zprostředkovanou, aktivací iniciační kaspázy-8 a nízkou hladinou intracelulárních inhibitorů kaspáz, zejména proteinu XIAP. Jsou charakteristické tím, že zvýšená exprese antiapoptotických proteinů (Bcl-2, Bcl-X_L) nebo zablokování proapoptotických proteinů (Bax, Bak), účastnících se vnitřní dráhy, nesníží jejich citlivost k apoptóze indukované skrze receptory smrti. Pokud k utlumení apoptózy dojde, jedná se o buňky typu II. Tyto buňky potřebují k plné aktivaci apoptotické signalizace amplifikaci závislou na mitochondriích a tedy vnitřní dráhu. Rozdělení na typ I a II nemusí být zcela jednoznačné a může se odvíjet od okolních podmínek i od hladiny inhibičních proteinů cFLIP a XIAP (Gonzalvez & Ashkenazi, 2010).

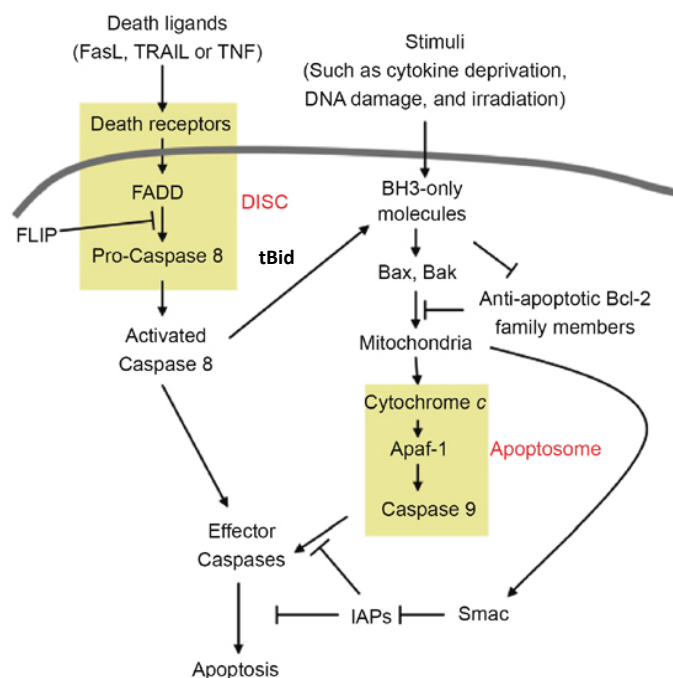
2.1.3 Vnitřní - mitochondriální dráha

Vnitřní dráha je primárně spouštěna intracelulárními podněty, např. geno- či proteotoxickým stresem, genomovou nestabilitou, UV záření, chemickým poškozením, volnými radikály, sníženým přísunem živin nebo růstových faktorů, energickou deprivací, virovou infekcí nebo aktivací onkogenů (Feig & Peter, 2007). Může být však iniciována i aktivní kaspázou-8/-10. V takovém případě kaspáza-8/-10 řezá protein Bid na kratší formu tBid (truncated Bid). Tím zapojuje do apoptotických procesů proteiny rodiny Bcl-2, které jsou nejdůležitějšími komponenty vnitřní dráhy. Zkrácení proteinu Bid vede k odhalení glycinu na N-konci, který je poté myristilován. Díky tomu může být tBid přenesen do vnější mitochondriální membrány, kde kompetitivní vazbou inaktivuje antiapoptotické proteiny

Bcl-2 rodiny (např. Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L) a navíc se přímo podílí na aktivaci a multimerizaci proapoptotických proteinů Bak a Bax. K inaktivaci antiapoptotických Bcl-2 proteinů a k aktivaci proapoptotických proteinů Bax a Bak přispívají další proapoptotické tzv. BH3-pouze proteiny z rodiny Bcl-2, např. Puma, Noxa, Bim, Bid (Li et al., 1998). Po odstranění blokujících proteinů mohou Bax a Bak multimerizovat a vytvořit tak póry ve vnější mitochondriální membráně. Tento proces vede k permeabilizaci vnější membrány (MOMP-mitochondria outer membrane permeabilization) a k následnému vylití složek mezimembránového prostoru do cytosolu. Nejdůležitějším procesem pro následnou signalizaci je uvolnění cytochromu c (Waterhouse et al., 2002, Li et al., 1998). Ten se za přítomnosti ATP/dATP váže na adaptorový protein Apaf-1 a iniciuje vznik apoptozomu. Prokaspáza-9 se díky své CARD doméně připojí k proteinu Apaf-1 a cytochromu c a tím dojde k její aktivaci. Aktivní kaspáza-9 dále štěpí a aktivuje exekuční kaspázy-3,-6,-7 (Li et al., 1997, Jiang & Wang, 2000) (**Obr. 2.1.2**).

Aby spontánně nedocházelo k nekontrolovatelným a nevratným apoptotickým změnám, je tato signalizační dráha kontrolována buněčnými inhibitory kaspáz. V cytosolu se nachází proteiny rodiny IAP (inhibitor of apoptosis protein), což je vysoce konzervovaná skupina inhibitorů kaspáz (XIAP, cIAP-1, c-IAP-2, survivin). Členové této rodiny mají jednu nebo více konzervovaných domén, obsahující repetitivní sekvence BIR (baculovirus IAP repeat) a někteří nesou také CARD doménu. Z nich zejména XIAP se svými BIR2 a BIR3 doménami váže k aktivním kaspázám-3 a -9 a inhibuje jejich aktivitu (Deveraux & Reed, 1999, van Loo et al., 2002).

Po permeabilizaci mitochondrií se do cytosolu dostanou ještě proteiny Smac/Diablo a HtrA2/Omi, které následně zablokují kaspázové inhibitory z rodiny IAP a tak může dojít k plnému rozvoji apoptózy. Dále se z mitochondrií uvolňují např. enzymy AIF a EndoG, které v jádře iniciují fragmentaci DNA a kondenzaci chromatinu (Du et al., 2000, van Loo et al., 2002). Exekuční kaspázy se poté postarají o aktivaci proapoptotických nukleáz (např. DFF40/CAD), kondenzaci chromatinu, přeskupení cytoskeletu a fosfolipidů v plazmatické membráně. Tyto procesy jsou potřebné k dokončení buněčné smrti bez toho, aniž by bylo narušeno okolí buňky a buňka mohla být v podobě váčků odstraněna fagocyty (Madera & Godson, 2003).



Obrázek 2.1.2 Základní dráhy apoptotické signalizace. Vnější dráha je spuštěna po navázání ligandu na receptory smrti. Poté dojde na cytosolické straně receptoru k vytvoření DISCu a tím k aktivaci iniciační kaspázy-8. Kaspáza-8 dále aktivuje efektorovou kaspázu-3 a je také schopná spustit vnitřní dráhu zkrácením proteinu Bid na tBid. Protein tBid iniciuje vytvoření komplexu v mitochondriální membráně (MOMP), který tvoří proteiny Bax a Bak. tBid také pomáhá inaktivovat antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2 a aktivovat proapoptotické (BH3-only). Po vytvoření porů v mitochondriích dojde k vylištění cytochromu c a vzniku apoptozomu. Tím se aktivuje kaspáza-9 a tak i další efektorové kaspázy. Dále se z mitochondrií uvolňují inhibitory inhibitorů kaspáz, čímž dojde k plné aktivaci exekučních kaspáz. Vnitřní dráha může být také indukována mnoha faktory z vnějšího okolí nebo buněčnými podněty (převzato z Xu & Shi, 2007).

2.2 TRAIL - apoptotický ligand z rodiny TNF

Ligandy z rodiny TNF a jejich příslušné receptory se podílejí zásadní měrou na indukci apoptózy. Interakce těchto ligandů s receptory je prvním krokem ke spuštění vnější apoptotické dráhy. Mezi nejznámější páry ligand-receptor, které jsou schopné indukovat apoptózu patří FasL-FasR, TNF α -TNF-R1, TRAIL a receptory DR4, DR5. Všechny tyto receptory se souhrnně nazývají receptory smrti a na svém cytoplasmatickém konci nesou DD doménu (death domain). Tato doména je důležitá pro přenos apoptotického signálu (Xu & Shi, 2007).

TNF α je sekretovaný cytokin, který je produkován zejména aktivovanými makrofágy během zánětu. Váže se jako homotrimer na TNF-R1 a následná signalizace nemusí být pouze

proapoptotická. V závislosti na ostatních signálech může dojít kromě indukce apoptózy také k aktivaci NF- κ B nebo MAP kinázové dráhy a expresi proteinů indukujících přežití buňky nebo zánět (Chen & Goeddel, 2002). Fas ligand je exprimován jako transmembránový protein II. typu. Nachází se zejména na povrchu aktivovaných T-lymfocytů. Podílí se tak na cytotoxickém účinku T-lymfocytů v imunitní odpovědi a udržování homeostáze během vývoje T-lymfocytů (Nakajima & Oka, 1997, Andersen et al., 2006). Dalším a nejmladším členem skupiny je TRAIL. Tento ligand je exprimován také jako transmembránový protein a jeho signalizační dráhy jsou podobné spíše Fas ligandu než TNF α . Momentálně je klinicky více atraktivní než předchozí dva ligandy a to díky tomu, že dokáže indukovat apoptózu u rakovinných buněk bez vedlejší toxicity k buňkám netransformovaným (Takeda et al., 2007).

2.2.1 Struktura a exprese ligandu TRAIL

TRAIL, známý také jako Apo2L, byl objeven a identifikován v roce 1995 na základě homologie k extracelulární doméně Fas a TNF α , při porovnávání sekvencí z EST knihovny (Ashkenazi et al., 1996, Wiley et al., 1995). Tato společná extracelulární C-terminální část se nazývá TNF homologní doména (THD). Je zodpovědná za formování homotrimerů a vyskytuje se u všech členů rodiny TNF (Wiley et al., 1995, Bodmer et al., 2002). TRAIL je exprimován jako transmembránový protein II. typu sdílející 20-30% homologii s ostatními členy rodiny TNF. Transmembránová forma je 281 aminokyselin (33-35 kDa) dlouhá a C-koncová (extracelulární) doména může být proteolyticky odštěpena, čímž se TRAIL stane solubilním (Wiley et al., 1995). Solubilní forma TRAILu se v organismu vyskytuje zejména při nádorovém onemocnění. Její hladina může být i uměle navýšena např. pomocí interferonů, což zřejmě vede k lepšímu odstranění nádorových buněk. Avšak příčina vytvoření solubilní formy je stále ještě nejasná a v organismu převládá forma membránová (Kimberley & Screaton, 2004, Tecchio et al., 2004, Jabłońska et al., 2005, Shi et al., 2005).

Krystalografickými studiemi bylo ověřeno, že TRAIL sdílí s ostatními členy rodiny nejen sekvenci homologii, ale i strukturní podobu. Membránový i solubilní TRAIL formují nekovalentně spojené homotrimery, které se váže na tři receptorové molekuly (Idriss & Naismith, 2000). Na rozdíl od ostatních členů z rodiny TNF, trimerní TRAIL nese mezi molekulami atom zinku. Zinek vázaný na cysteiny 230 zajišťuje stabilitu a biologickou aktivitu TRAILu. Pouze tento homotrimer může vázat a aktivovat tak receptory smrti. Bez tohoto koordinovaného atomu zinku má TRAIL tendenci agregovat a pokud je cystein 230 mutován, je narušena i schopnost TRAILu indukovat apoptózu (Hymowitz et al., 2000, Seol

& Billiar, 2000, Cha et al., 1999).

Na rozdíl od jiných ligandů z rodiny TNF, které se nacházejí pouze na aktivovaných buňkách, je TRAIL v organismu exprimován konstitutivně, zejména hematopoetickými buňkami (hojně NK buňkami). TRAIL je také ve větším měřítku detekovatelný v thymu, slezině, prostatě, vaječnících, střevě a placentě. Avšak jeho exprese závisí na mnoha faktorech, jako je např. zralost buněk, interleukinové, interferonové prostředí a okolní vlivy (Wiley et al., 1995, Smyth et al., 2003).

2.2.2 Fyziologická a protinádorová funkce ligandu TRAIL

Ačkoli je TRAIL intenzivně zkoumán jako nadějný protinádorové terapeutikum, o jeho fyziologickém významu toho příliš známo není. Nejdříve byla TRAIlem indukovaná apoptóza považována za součást negativní selekce lymfocytů v thymu. Po sérii pokusů s TRAIL-deficientními myšmi se tato teorie nepodařilo s jistotou potvrdit. Deficience neměla u některých myšů žádný vliv na lymfoidní ani myeloidní homeostázi či funkci (Sedger et al., 2002). Na druhou stranu, další pokusy odhalily u myšů zvětšený thymus, nárůst nezralých lymfocytů a zvýšený výskyt autoimunitních chorob (Lamhamedi-Cherradi et al., 2003). Určitou spojitost TRAILu s potlačováním autoimunity prokazuje také jeho schopnost tlumit autoimunitní zánět u revmatoidní artritidy, roztroušené sklerózy a diabetu I. typu. U myšů s potlačenou expresí TRAILu (TRAIL^{-/-}) docházelo k většímu rozvoji těchto chorob, zatímco po zvýšení hladiny TRAILu došlo k vymizení příznaků autoimunity (Bouralexis et al., 2005, Falschlehner et al., 2009). Další studie ukazují, že TRAIL se zřejmě účastní regulace periferních CD8⁺ T lymfocytů skrze CD4⁺ pomocné T-lymfocyty a podílí se tak na udržení periferní tolerance a zrání CD8⁺ T lymfocytů. Je také možné, že CD8⁺ lymfocyty produkují solubilní formu TRAILu a tím ovlivňují další okolní buňky bez přímého kontaktu (Janssen et al., 2005). Zajímavostí je, že TRAIL nemusí způsobovat u cílových buněk pouze apoptotickou odpověď, pokud převládne v signalizaci NF-κB dráha nad proapoptotickou, vede to k proliferaci buněk vaskulární hladké svaloviny (Kavurma et al., 2008). Obecně zvýšená aktivace NF-κB dráhy vede k růstu nádorů a častějším metastázám a větší nádorové invazivitě (Mellier et al., 2010).

Nejzásadnější role TRAILu je zřejmě v protinádorové obraně. Avšak i tato funkce se odvíjí od konkrétního typu nádoru a tkáně. Například u TRAIL^{-/-} myšů došlo, na rozdíl od myšů kontrolních, po transplantaci TRAIL senzitivního nádoru k agresivní nádorové proliferaci a tvoření jaterních metastáz. Právě jaterní nádory jsou typické pro TRAIL deficientní myš, neboť jaterní NK buňky indukují apoptózu nádorových buněk zejména

skrze TRAIL. Nepřítomnost TRAILu tudíž vytváří vhodné prostředí pro rozvoj těchto nádorů (Cretney et al., 2002, Takeda et al., 2001). Bylo také prokázáno, že TRAIL hraje významnou roli v potlačování vzniku nádorových metastáz. Chemicky indukované nádory vytvářely v TRAIL^{-/-} myších řádově více agresivních lymfatických metastáz (Grosse-Wilde et al., 2008). Obecně lze říci, že lymfomy a nádory indukované karcinogenem nebo metastázy lymfoidních uzlin rostou v TRAIL nebo DR4/5 deficientních myších mnohem rychleji (Finnberg et al., 2008, Falschlehner et al., 2009, Grosse-Wilde et al., 2008).

Mezi významné aktivátory exprese TRAILu patří zejména interferon gamma (IFN- γ). Dendritické buňky, periferní T lymfocyty, CD4⁺ lymfocyty a monocyty, které jsou stimulovány IFN- γ jsou schopné pomocí TRAILu indukovat apoptózu u nádorových buněk. Zřejmá spojitost mezi IFN- γ a NK buňkami poukazuje na možný protivirový účinek TRAILu. TRAIL je jeden z prvních genů aktivovaných při infekci cytomegalovirem (CMV) a navíc virem nakažené buňky jsou citlivější k apoptóze indukované TRAIlem. Všechny tyto i mnoho dalších možných fyziologických funkcí TRAILu, jako je úloha ve vývoji B lymfocytů, červených krvinek, tlumení imunitního systému v imunoprivilegovaných orgánech, musí být ještě dále upřesněny (shrnuto v Bouralexis et al., 2005, Kimberley & Screaton, 2004).

Skutečnost, že TRAIL je schopen selektivně zničit nádorové buňky bez poškození zdravých buněk, jej předurčila do role potenciálně velice nadějného protirakovinného léčiva. Probíhající předklinické a klinické testy ukazují, že solubilní rekombinantní lidský TRAIL i humanizované agonistické protilátky proti TRAILovým receptorům vykazují zřetelný protinádorový efekt *in vitro* i *in vivo* u různých typů malignit, např. u nádoru tlustého střeva, plic, slinivky či glioblastomu (Ashkenazi, 2002, Zhao et al., 2012, Ashkenazi et al., 2008). Avšak asi 50% primárních nádorů, např. leukemií, meduloblastomů, astrocytomů, gliomů, je k monoterapii TRAIlem rezistentní (Zhao et al., 2012, Ashkenazi et al., 2008). Rezistence mohou mít velice různorodý původ, ať uvažujeme nefunkčních receptorech, signalizaci, inhibici receptorů, nadprodukcí inhibitorů apoptózy, poklesu/mutaci pro-apoptotických proteinů nebo aberantní aktivaci antiapoptotických drah (shrnuto v Mahalingam et al., 2009, Mellier et al., 2010). Proto je velice důležité detailně popsat regulační mechanismy TRAIlem indukované apoptózy, aby bylo možné konkrétní rezistenci potlačit.

Ukazuje se, že kombinace TRAILu (či agonistických protilátek) s některými používanými či testovanými protinádorovými terapeutiky může vést k efektivnější indukci apoptózy nádorových buněk a potlačení růstu nádoru (Ashkenazi et al., 2008). Protinádorová

léčiva jako cisplatina, Rituximab, Sorafenib, Doxorubicin a mnoho dalších jsou nyní v I. nebo II. fázi klinických testů jako pomocné senzitivizátory k TRAILem indukované apoptóze (Zhao et al., 2012).

2.2.3 Receptory ligandu TRAIL

V lidském organismu může TRAIL interagovat s pěti receptory. První z nich DR4/TRAIL-R1/TNFRSF10A byl objeven v roce 1997, opět na základě prohledávání EST databází při použití sekvence cytoplasmatické DD domény TNF-1 receptoru (Pan et al., 1997b, MacFarlane et al., 1997). Přibližně ve stejné době jako DR4 (death receptor 4) byl objeven i druhý z proapoptotických TRAILových receptorů DR5/TRAIL-R2/TNFRSF10B. DR5 také nese vysoce konzervovanou DD doménu a stejně jako DR4 patří mezi transmembránové proteiny typu I. Oba obsahují kromě konzervované DD domény také extracelulární doménu bohatou na cysteiny - CRD (**Obr. 2.2.2**) (Pan et al., 1997a, MacFarlane et al., 1997). DR4 a DR5 sdílí 58% homologii a zdá se, že se mohou v organismu zastupovat a zvyšovat tak pravděpodobnost odpovědi na TRAIL a tím i naději na rozpoznání a usmrcení transformovaných buněk (Bouralexis et al., 2005).

Hlavní funkcí těchto receptorů je aktivovat apoptózu po navázání TRAILu a proto byly pojmenovány jako receptory smrti. Jsou exprimovány prakticky všemi buňkami v organismu a ve zvýšené míře např. aktivovanými T lymfocyty, kde mají klíčovou roli při indukci apoptózy a udržování tkáňové homeostáze (Chaudhary et al., 1997, MacFarlane et al., 1997).

TRAIL je schopen vázat kromě těchto dvou aktivačních receptorů další tři, které nemohou indukovat apoptózu. Jedná se tzv. decoy (návnadové) receptory. Dva z těchto receptorů DcR1 (TRAIL-R3/TNFRSF10C) a DcR2 (TRAIL-R4/TNFRSF10D) mají z části stejnou extracelulární doménu jako DR4/5. DcR2 má zkrácenou cytoplasmatickou část. DcR1 dokonce tuto část zcela postrádá a je připojen k membráně pouze GPI kotvou (**Obr. 2.2.2**). Oba receptory tedy nemají funkční DD doménu a nejsou schopné přenést apoptotický signál.

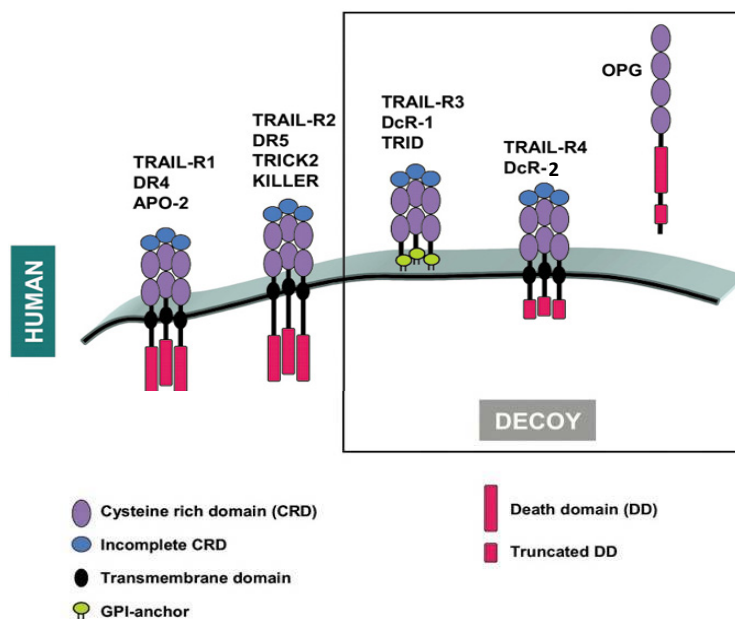
Posledním z receptorů je solubilní receptor osteoprotegerin (OPG) (**Obr 2.2.2**). OPG byl nejdříve popsán jako inhibiční receptor vázající RANKL, což je ligand z rodiny TNF účastnící se proliferace osteoklastů. I přes to, že OPG váže při 37 °C TRAIL s níž afinitou než ostatní receptory, zdá se, že je zodpovědný za určité typy rezistencí vůči TRAILu (Holen et al., 2002, Truneh et al., 2000, Shipman & Croucher, 2002, Shipman & Croucher, 2003).

Jak u nás podstaty decoy receptorů vyplývá, mohla by jejich nadprodukce vést

k rezistenci vůči TRAILu. Z části tomu tak zřejmě je, protože se prokázalo, že zvýšená exprese DcR1/2 potlačuje TRAIlem indukovanou apoptózu (Degli-Esposti et al., 1997, Riccioni et al., 2005). Nové studie ukazují, že se nejedná o pouhé vychytávání TRAILu. Je pravděpodobné, že DcR1 je lokalizován spolu s proapoptotickými receptory uvnitř lipidových raftů a může zabraňovat tvoření klasických trimetrů a tím aktivaci skrze DD domény (Merino et al., 2006). Buněčné linie, které vykazují nízkou hladinu exprese DcR1 jsou k TRAILu senzitivní a naopak buňky s vysokou expresí se stávají rezistentními (Sheridan et al., 1997). DcR2 může navíc skrze svou zkrácenou cytosolickou část aktivovat NF- κ B dráhu, která vede k proliferaci buněk a inhibici apoptózy (Bernard et al., 2001). Na druhou stranu ale nebyla zjištěna žádná přesná korelace mezi expresí decoy receptorů a výskytem rezistencí (Zhang et al., 1999). To však může být zapříčiněno širokou škálou mechanismů vedoucích k rezistenci a tím, že exprese death i decoy receptorů se dynamicky mění (Zhang et al., 2000).

Při signalizaci skrze DR4/DR5 hrají také svou roli posttranslační modifikace. Extracelulární části obou receptorů jsou různou měrou O-glykosylovány a byla prokázána jasná spojitost mezi zvýšenou hladinou glykosylačních enzymů (GALNT3/14, FUT3/6) a senzitivitou nádorových buněk k TRAILu. Při potlačení exprese těchto enzymů docházelo k horšímu formování DISCu a k poklesu aktivní formy kaspázy-8 a naopak. O-glykosylace nemění hladinu DR4/DR5 v buňce, ale zřejmě přispívá k seskupování receptorů na membráně (Wagner et al., 2007). Další vliv na signalizaci má pravděpodobně palmitoylace receptoru DR4. Zdá se, že tato modifikace působí pozitivně na formování trimerů a lokalizaci receptorů do lipidových raftů. Konstitutivní palmitoylace DR4 a FasR byla nalezena u nádorových buněk (Rossin et al., 2009)

Je zřejmé, že jakákoli změna v expresi, posttraslační modifikaci, transportu receptoru na membránu nebo mutace může zapříčinit ztrátu či snížení funkce DR receptorů a tím i rezistenci vůči TRAILu (přehledně shrnuto v Mellier et al., 2010)



Obrázek 2.2.2 Lidské receptory ligandu TRAIL. Proapoptotické receptory DR4 a DR5 obsahují tři různé domény. Fialově znázorněná na cystein-bohatá doména (CRD) je důležitá pro vazbu trimerního ligandu. Transmembránová doména ukotvuje receptor v cytoplasmatické membráně a červená death doména je nezbytná pro indukci apoptózy. Decoy receptory buď zcela postrádají death doménu (DcR1 a OPG) nebo mají pouze zkrácenou část, která ale nemůže aktivovat apoptotickou signalizaci. DcR1 je v membráně vázán GPI kotvou. OPG není membránový, ale solubilní receptor. Všechny decoy receptory jsou tedy schopné vázat TRAIL, ale neaktivují apoptotické děje (převzato a upraveno z Lorz et al., 2009)

2.2.4 Apoptotická signalizace indukovaná skrze ligand TRAIL

Navázání trimerního TRAILu na DR4 nebo DR5 je prvním krokem vedoucím k indukci apoptózy. Poté, co se ligand spojí s receptorem, dojde k oligomerizaci a seskupování receptorů a tím se dostanou do kontaktu i cytosolické DD domény. Následně se k cytosolické části receptoru připojí, díky své DD doméně, adaptorový protein FADD, který zároveň nese i tzv. DED doménu (death effector domain). Dalším proteinem, který asociuje s tímto komplexem je iniciační kaspáza-8 nebo -10 (Kischkel et al., 2000). Obě tyto kaspázy mají na N-konci DED doménu, díky které jsou seskupovány u DED domény adaptorového proteinu FADD. Tento komplex, který tvoří receptory, adaptorové proteiny FADD a iniciační kaspázy -8/-10 se nazývá DISC (death inducing signaling komplex) a jeho zformování je nezbytné pro aktivaci iniciačních kaspáz a k indukci apoptózy (**Obr. 2.2.4, 2.2.5**) (Kischkel et al., 1995, Kischkel et al., 2000). Kaspáza-8 má v během apoptotické signalizace významnější roli než kaspáza-10. Ta byla objevena o něco později a zdá se, že

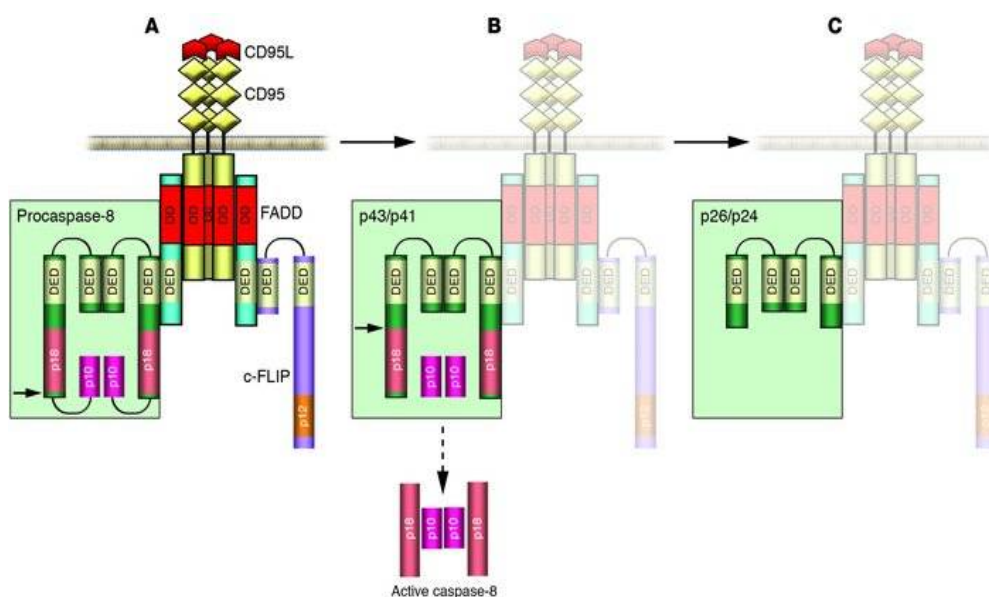
bez kaspázy-8 není schopná spustit apoptózu (Sprick et al., 2002).

Po vytvoření DISCu dojde k prvnímu aktivačnímu řezání kaspázy-8 (55 kDa). Nejdříve se oddělí malá podjednotka, tím se kaspáza rozdělí na p10 a p43/41 podjednotky. Tato, již částečně řezaná, kaspáza je stále součástí DISCu. A poté, co je provedeno tzv. maturační řezání se oddělí i velká podjednotka p18. Aktivovaná kaspáza-8 se uvolní do cytosolu a tvoří aktivní tetrametr složený ze dvou malých p10 a dvou velkých p18 podjednotek (**Obr. 2.2.4**) (Lavrik et al., 2003).

Dalším protein, který je součástí DISCu je důležitý inhibitor iniciačních kaspáz cFLIP. cFLIP také obsahuje dvě DED domény proto je schopen, obdobně jako kaspáza-8, interagovat s adaptorem FADD a tím kompetitivně inhibovat vazbu kaspáz do DISCu (**Obr. 2.2.4**). cFLIP je exprimován ve třech různých sestřihových formách. Nejčastější varianty jsou cFLIP-L (large-dlouhý) a cFLIP-S (small-malý), cFLIP-R je méně obvyklý a je podobný variantě S (Golks et al., 2005). Kratší varianty velice účinně kompetitivně inhibují vazbu kaspázy-8 k DISCu. Delší varianta FLIP-L může jak inhibovat (při nadprodukcí), tak i zvyšovat (při nízké koncentraci) řezání a aktivaci iniciačních kaspáz-8/-10 (Guicciardi & Gores, 2009). cFLIP-L je v DISCu také velmi rychle a účinně řezán kaspázou-8. Jeho p43 fragment spoluaktivuje NF-κB dráhu skrze interakci s IKK komplexem. Zvýšená exprese některé varianty cFLIPu může vést k rezistenci u mnoha různých typů nádorů, např. karcinomu tlustého střeva, hepatocelulárního karcinomu, melanomu, karcinomu endometria (Dolcet et al., 2005, Lippa et al., 2007, Ryu et al., 2001).

Kaspáza-8 také podléhá ubiquitinilaci, která ale v tomto případě nevede k její degradaci, ale naopak zvyšuje její aktivitu. Ubiquitinilace kaspázy-8 je zprostředkována s DISCem asociovanou E3 ligázou CUL-3. K ubiquitinylaci jsou kromě CUL-3 potřebné také proteiny RBX1 a p62. Ty napomáhají translokovat aktivní ubiquitinilovanou kaspázu-8 do specifických, na ubiquitin bohatých agregátů, což vede k její plné aktivaci a indukci apoptózy (**Obr. 2.2.5**) (Jin et al., 2009). Kaspáza-8 může být také fosforylována kinázou Src, čím dochází k její inhibici. Naopak inhibitor Src kinázy PP2 zvyšuje aktivaci kaspázy-8 (Cursi et al., 2006).

Pokud nedojde k inhibici iniciačních kaspáz, jsou následně přímo aktivovány exekuční kaspázy-3, -6, -7. V případě, že je apoptóza indukována v buňkách II. typu, dochází i u TRAILové signalizace k propojení s vnitřní apoptotickou dráhou (popsáno v kapitole 2.1.3.).



Obrázek 2.2.4 DISC receptor Fas/CD95 a postupná aktivace kaspázy-8. Obrázek ukazuje kinetiku vzniku FasL-FasR-DISC komplexu a jím zprostředkovanou postupnou aktivaci kaspázy-8. Celý proces je aktivován interakcí trimerního ligandu (vyobrazen červeně) s receptorem. Následuje oligomerizace receptorů a asociace proteinu FADD, který interaguje svou death doménou (DD-červeně) s receptorem. Na opačném konci nese DED doménu (světle žlutá), kterou obsahuje i prokaspáza -8/-10 a inhibitor cFLIP. **A)** Dochází k homofilické interakci těchto domén a formování DISCu. Pokud převládnu proapoptotické signály, kaspáza se začne štěpit. První štěpení probíhá v místě mezi malou (p10, fialová) a velkou (p18, růžová) podjednotkou - naznačeno šipkou. **B)** Malé podjednotky zůstávají v DISCu a formují se zbytkem kaspázy heterotetramer. Tímto vzniká komplex o velikosti 41/43 kDa (dvě různé sestřihové varianty kaspázy). Následně dochází ke druhému štěpení mezi N-koncovou death doménou a velkou podjednotkou - naznačeno šipkou. Tím se kaspáza stává aktivní a difunduje do cytosolu. **C)** Na DISCu zůstává pouze N-koncová doména. Zobrazen je Fas/CD95 receptor, u TRAILu a DR4/5 tyto děje probíhají stejně (převzato z Lavrik et al., 2005).

2.2.5 Neapoptické signalizační dráhy ligandu TRAIL

Ačkoliv hlavní funkcí TRAILu a receptorů DR4/DR5 je indukce apoptotické dráhy, bylo prokázáno, že TRAIL je schopen aktivovat i s apoptózu nesouvisející pro-proliferální dráhy. Podobně jako další death ligandy FasL nebo TNF α aktivuje TRAIL NF- κ B signalizační dráhu, MAP kinázovou signalizaci, PI3K-PKB/Akt kinázy a také autofagocytózu skrze TAK1 kinázu (Secchiero et al., 2003, Falschlehner et al., 2007, Herrero-Martin et al., 2009). Za aktivaci neapoptické signalizace je zodpovědný především sekundárně vznikající signalizační komplex 2. Tento cytosolický komplex obsahuje FADD, kaspázu-8 a adaptorové proteiny RIP1 a TRAF2. Protein RIP1 je serin/threoninová kináza, která je schopná autofosforylace a následně aktivuje další substráty, kterými jsou

IKK/NEMO (I κ B kinase) nebo některá z MAP kináz (**Obr. 2.2.4**). Kináza IKK (složená z podjednotek α , β , γ) fosforyluje inhibitor I κ B. P-I κ B se disociuje od NF- κ B a tím se odkryje signální sekvence pro transport NF- κ B do jádra a tak dojde ke změně exprese cílových genů (Hu et al., 1999). Tato dráha může mít za následek zvýšení hladiny antiapoptotických proteinů, jako je cFLIP, Bcl-X_L, Mcl-1 a inhibitory rodiny IAP (Stehlik et al., 1998, Wang et al., 1998, Karin & Lin, 2002, Braeuer et al., 2006). Přesné složení komplexu 2 a jednotlivé funkce komponentů však nejsou dosud zcela objasněny.

Kromě NF- κ B dráhy může být skrze komplex 2 aktivováno několik MAP kinázových drah. Není stále přesvědčivě vysvětleno, jaké dráhy se této signalizace účastní, ale opakovaně byla popsána aktivace kináz JNK, p38 a Erk. Zdá se, že aktivace p38 nevyžaduje TRAF2 a JNK kináza zase RIP1, takže i indukce signalizace může být odlišná. Navíc tyto dráhy mohou mít jak proapoptotický (JNK), proliferační (Erk), tak i ve výsledku žádný účinek. Navíc skutečnost, že MAP kinázové dráhy jsou zapojeny do mnoha buněčných procesů, značí, že je a bude velice těžké přesně ustanovit komponenty a důsledky této signalizace (Varfolomeev et al., 2005, Grant & Dent, 2004). Signalizace i výsledná odpověď skrze NF- κ B i kinázovou dráhu je slabší než u receptoru TNF-R1 a při plné aktivaci apoptotické signalizace nemá příliš velký vliv na konečný osud buňky. Pokud je však apoptotická signalizace inhibována (např. blokováním aktivity kaspáz proteinem XIAP, či inhibicí mitochondriální apoptotické signalizace antiapoptotickými proteiny z rodiny Bcl-2), TRAILem indukovaná aktivace těchto vedlejších drah vede naopak k buněčné proliferaci nebo ke zvýšení rezistence vůči apoptóze (Braeuer et al., 2006).



Obrázek 2.3 Souhrn signalizačních drah po navázání ligandu TRAIL. TRAIEm indukovaná apoptóza je spuštěna po navázání trimerního ligandu TRAIL na aktivační receptory DR4/DR5. Signalizace pokračuje formováním DISCu a aktivací kaspázy-8/-10. Kaspáza-8 je ubiquitinylována (pozitivní regulace proteinem CUL-3, negativní A20). Ubiquitinylovaná kináza-8 je přemístěna za pomoci proteinů p62 a RBX1 do specifických agregátů, čímž dochází k významnému zvýšení její aktivity. Aktivovaná kaspáza-8 dále štěpí a tím zároveň aktivuje exekuční kaspázy-3,-6,-7 a proapoptický protein Bid (vzniká truncated Bid – tBid). tBid aktivuje mitochondriální dráhu a dojde k vytvoření apoptozomu (cytochrom c + Apaf-1 + kaspáza-9). Aktivovaná kaspáza-9 obdobně jako kaspáza-8 štěpí a aktivuje exekuční kaspázy. O-glykosylace DR4/DR5 a palmitoylace DR4 mají také pozitivní vliv na seskupování receptorů a následnou signalizaci. Navíc TRAIL může indukovat i neapoptickou signalizaci. Dochází k vytvoření cytoplasmatického komplexu 2 (FADD, kaspáza-8, RIP, TRAF2 a IKK), který aktivuje členy NF-κB dráhy, MAP kinázovou signalizaci nebo PI3K/Akt kinázu. Celý komplex TRAIL-receptor-DISC je pravděpodobně během tohoto procesu internalizován klatrinem zprostředkovanou endocytózou (převzato z Gonzalez & Ashkenazi, 2010).

2.3 Základní endocytické dráhy

Endocytóza je proces, při kterém dochází k pohlcování membránových nebo extracelulárních komponent pomocí endocytických váčků. Endocytóza existuje v několika odlišných formách (**Obr. 2.3**). V zásadě ji můžeme rozdělit na klatrinem zprostředkovanou a na klatrinu nezávislou endocytózu. Většina receptorů je internalizována více regulovanou a nejlépe charakterizovanou klatrinovou drahou. Méně specifické druhy endocytózy, jako je fagocytóza a (makro)pinocytóza, jsou na klatrinu nezávislé. Do této skupiny patří i endocytóza caveolinových váčků, která je zřejmě závislá na membránovém mikroprostředí (raftech) a může skrze ní docházet k internalizaci membránových proteinů, bakteriálních toxinů nebo virů. To, zda je endocytóza zprostředkována klatrinovou nebo na klatrinu nezávislou drahou, je důležitým faktorem pro další charakterizaci endocytické dráhy (Sharma et al., 2004, Ramanan et al., 2011).

2.3.1 Endocytóza zprostředkovaná klatrinovými váčky

Endocytóza zprostředkovaná klatrinovými váčky je zodpovědná za internalizaci živin, patogenů, růstových faktorů a zejména pak receptorů. Nejdůležitějšími komponenty obalu těchto váčků jsou klatrin a adaptorový protein 2 (AP2) (Le Roy & Wrana, 2005). Základní jednotka klatrinu, ze které se následně staví celý obalový plášť váčku se nazývá triskelion. Skládá se ze tří těžkých řetězců (clathrin heavy chain, CHC) a ze tří kratších lehkých řetězců (clathrin light chain, CLC). Těžký řetězec obsahuje vazebná místa pro AP2 a další pomocné proteiny (Greene et al., 2000).

Adaptorový protein 2 je velký komplex, skládající se ze čtyř podjednotek α , β_2 , μ_2 a δ_2 . β_2 podjednotka (100 kDa) je zodpovědná za vazbu AP2 na klatrin a zřejmě je schopná rozpoznat obsah váčku. Podjednotka α (100kDa) nese sekvenci pro lokalizaci na plasmatickou membránu a interaguje s dalšími adaptory (AP180, amphiphysin). Podjednotka μ_2 (50kDa) je především zodpovědná za rozpoznání přepravovaného proteinu a pomáhá nasednutí AP2 na klatrin (Page & Robinson, 1995). Navíc obsahuje vysoko afinitní místo pro vazbu PIP_2 (fosfatidilinositol-4,5-difosfát) a může aktivovat PIP kinázu a tím regulovat hladinu PIP_2 v membráně (Krauss et al., 2006). AP2 je schopen rozpoznávat a vázat specifické internalizační motivy na endocytovaných proteinech, dileucinový motiv DXXLL/[DE]XXL[LI] a tyrosinový motiv YXX Φ (Φ značí hydrofobní AMK). Oba motivy můžeme najít na hojně endocytovaných receptorech a odpovídají za nasměrování daného proteinu do endozomu nebo lyzozomu (Bonifacino & Traub, 2003). Z funkcí AP2 vyplývá,

se významně podílí na seskupování pláště váčku, procesu vyklenutí, rozpoznávání obsahu a tím cílení váčku do organel.

Dalším proteinem, který hraje důležitou roli ve formování váčku je synaptojanin. Jedná se fosfoinositidovou fosfatázu, která mění PIP_3 na PIP_2 a PIP . Správná hladina PIP_2 je důležitá pro vytvoření váčku, endocytózu a disociaci obalu. Proto musí být synaptojanin přítomen v obalu po celou dobu internalizace (Rusk et al., 2003).

Pro oddělení váčku od membrány je potřebná GTPáza dynamin. Dynamin má N-koncovou doménu, která váže a hydrolyzuje GTP, tím dochází k postupnému utahování hrdla váčku (Muhlberg et al., 1997). Přesný mechanismus odštěpování není zcela upřesněn. Zřejmě se jedná o kompromis mezi uzavíráním konců váčku, za které jsou zodpovědné PH domény nacházející se v centrální části dynaminu. PH domény mají vysokou afinitu k PIP_2 , který se nahromadí právě v okolí hrdla váčků a snaží se dostat tyto dvě na PIP_2 bohaté části k sobě, což je energeticky výhodnější. Ale zřejmě zde funguje i něco jako řoubovité utahování. Bylo pozorováno, jak hydrolýza GTP způsobuje rotaci proteinů kolem hrdla váčku, takže je možné, že se oba způsoby kombinují (Roux et al., 2006).

Brzy po internalizaci se klatrinový plášť rozpadá. Aktivní synaptojanin snižuje obsah PIP_2 ve váčku. AP2 tak přestane PIP_2 vázat a tím započne rozbalování. Disociaci obalu zřejmě pomáhá i malá GTPáza Rab5, která ovlivňuje fosforylaci AP2 a tím jeho odpoutání od váčku (Semerdjieva et al., 2008). Následně po rozbalení váček přechází v časný endozom. Pro časný endozom jsou typické malé GTPázy Rab4, Rab5 a EEA1 (early endosome antigen 1) (Mu et al., 1995, Platta & Stenmark, 2011). Rab5 se stará o hladinu PIP_3 aktivací PI3 kináz v membráně časného endozomu a je důležitý spolu s EEA1 pro fúzi váčků. Zastává však ještě mnoho dalších funkcí (shrnuto v Stenmark, 2009). EEA1 funguje jako marker časného endozomu a je rozpoznáván přicházejícími váčky (Christoforidis et al., 1999). V časném endozomu může docházet k signalizaci stejně, jako je tomu na membráně, ale díky odlišnému složení membrány může být signalizace utlumena nebo naopak aktivována. Časný endozom je prvním místem, kde se rozhoduje o dalším osudu internalizovaného objektu. Může být transportován recyklačním, Rab11-pozitivním váčkem zpět na membránu nebo může pokračovat do multivesikulárního těliska (MVB), pozdního endozomu a lyzozomu (**Obr. 2.4**) (Platta & Stenmark, 2011).

Tím, jak se odštěpují recyklační váčky (např. s transferinovým receptorem) a časné endozomy fúzí, dochází k maturaci celého komplexu a přeměně časného endozomu na pozdní. Ten má díky zvýšené aktivitě V-ATPázy nižší pH a oproti časnému endozomu větší velikost. Pozdní endozom může mít také formu tzv. „multivesicular body“ (MVB), kdy

váčky zůstávají ještě ohraničené membránou (Futter *et al.*, 1996). Přejít z časného endozomu do MVB může být řízen ubiquitylací receptoru. Ubiquitin je rozeznán komplexem ESCRT-I, -II a -III (endosomal sorting complex required for transport), který směřuje proteiny z časného endozomu do MVB (Hurley, 2008). Přeměna endozomu je také doprovázena výměnou malých GTPáz. Pro pozdní endozom je typická přítomnost malých GTP proteinů Rab7 a Rab9 namísto Rab5 a Rab4. Pokud se na pozdním endozomu nachází Rab7, může dojít k fúzi s lyzozomem (Rink *et al.*, 2005).

Ačkoliv v pozdním endozomu/MVB u dochází spíše k utlumení signalizace, může v některých případech docházet i k aktivaci, např. ke spuštění Erk či Wnt signalizační dráhy. Také se může dojít k odstranění inhibitorů signalizace a tím se signál posílí (Platta & Stenmark, 2011, Taelman *et al.*, 2010).

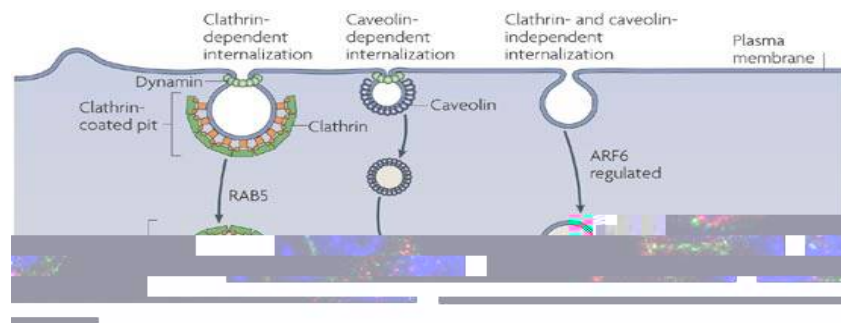
Lyzozom je jednoduše organizovaná organela bez složitého vnitřního uspořádání. Uvnitř lyzozomu je velice nízké pH. Pohybuje se mezi hodnotami 4,5 - 5 a je udržováno stálou aktivitou V-ATPázy. Díky tomu dochází snadno k degradaci přítomných molekul. Navíc je zde vysoký obsah hydrolytických enzymů, které fungují pouze při nízkém pH, což degradaci ještě podporuje (Sun-Wada *et al.*, 2003).

2.3.2 Na klatrinu nezávislá endocytóza

Caveolinem zprostředkovaná endocytóza je nejlépe definovaná a nejvíce prozkoumaná na klatrinu nezávislou endocytickou drahou. V tomto případě se membrána vyklenuje do podoby baňky za přítomnosti specifického membránového mikroprostředí - membránových raftů. Pro to, aby mohl vzniknout tento druh váčky, musí být v membráně přítomen cholesterol a s caveolinem-1 interagující sfingolipidy, které stabilizují strukturu váčky (Pelkmans & Zerial, 2005, Sargiacomo *et al.*, 1995, Sharma *et al.*, 2004). Nejdůležitější komponenta těchto váček je zřejmě caveolin-1. U buněk myši, které neexprimují caveolin-1, nebyla pozorována tato endocytická dráha (Lipardi *et al.*, 1998, Razani *et al.*, 2002). Kromě toho, i se caveolinové váčky podílí na udržení cholesterolové homeostáze, jsou skrze ně endocytovány také proteiny vázané GPI kotvou, E-cadherin, cholera toxin a částice viru SV40 (Fielding & Fielding, 1997, Norkin *et al.*, 2002, Cheng *et al.*, 2006, Kurzchalia & Parton, 1999). Po internalizaci caveolinové váčky zřejmě interagují s klasickou endocytickou drahou, tzn. fúzí s endozomy (**Obr. 2.3**) (Pelkmans *et al.*, 2004).

Další dráhy, které jsou na klatrinu nezávislé, nejsou tak dobře prozkoumány nebo se jedná o endocytózu nespecifických částic, ať u kapalných - pinocytóza nebo pevných - fagocytóza. Některé receptory (např. receptor pro interleukin-2) jsou internalizovány jak na

klatrinu, tak na caveolinu nezávislou drahou. Těchto méně častých endocytických drah se také účastní malé GTPázy, jako např. cdc42, ARF6 nebo RhoA (Lamaze et al., 2001, Mayor & Pagano, 2007).



Obrázek 2.3 Základní endocytické dráhy. Endocytóza může být zprostředkována klatrinovými váčky, caveolinovými váčky či dalšími, zatím blíže neurčenými, drahami. Na klatrinové váčky se váže klatrin ve formě triskelionu. U caveolinových je nejdůležitějším obalovým proteinem caveolin-1. Oba typy váček jsou od membrány odštěpeny dynaminem za využití energie z hydrolýzy GTP. Následně vzniká časný endozom, pro který je typický Rab5 a EEA1. Poté může dojít k recyklaci zpět na membránu, která je zprostředkována mimo jiné i malou GTPázou Rab11. Váčky mohou také dále fúzovat a tvořit pozdní endozom (Rab7 pozitivní) nebo multivesicular body (MVB). Jejich cesta končí v lyzozomu, kde je obsah váčku degradován (převzato z Gould & Lippincott-Schwartz, 2009)

2.3.3 Endozomální a lyzozomální acidifikace

Nízké pH v lyzozomech a endozomech je potřebné pro recyklaci receptorů, pohyb a maturaci organel, aktivitu iontových kanálů, hydroláz a dalších enzymů, které fungují v prostředí s kyselým pH (Sun-Wada et al., 2003). Za snižování pH v buněčných kompartmentech je zodpovědný enzym V-ATPáza. Jedná se o protonovou pumpu, která za spotřeby ATP zvyšuje hladinu H^+ v organelách. V-ATPáza je přítomna již v endozomech, kde udržuje pH mezi 6,8-5,5. Snížení pH v endozomu také přispívá k disociaci ligandu a následné recyklaci receptoru (Mellman, 1996). V-ATPáza funguje také jako pH senzor a

tím dokáže udržet aciditu kompartmentu ve správných mezích. Do endozomů je translokována váčky obsahující proteiny ARNO a Arf6, které jsou zásadní pro indukci acidifikace (Breton & Brown, 2007). Spolu s V-ATPázou se stává aktivní také iontový kanál pro Cl^- , který vyrovnává zvýšenou hladinu protonů. Díky aktivaci Cl^- kanálu může V-ATPáza stále pumpovat H^+ do lumen endozomů. Postupným snižováním pH a na hodnotu 5 je umožněna fúze pozdního endozomu s lyzozomem za účasti malého GTP proteinu Rab7. Následně dochází k degradaci obsahu lyzozomálními enzymy (Sun-Wada et al., 2003).

Jedním z aktivních lyzozomálních enzymů je kyselá sfingomyelináza (ASM). Její optimální pracovní pH je mezi 4,5-5, což zaručuje právě prostředí lyzozomů a pozdních endozomů (Fowler, 1969). ASM konvertuje sfingomyeliny na ceramidy, které jsou jednak integrovány do buněčných membrán a mohou se také podílet na aktivaci některých signálních drah. ASM také pravděpodobně hraje roli při FasL či $\text{TNF}\alpha$ indukované apoptóze. Aktivovaná kaspáza-8 se podílí na zvýšení aktivity ASM a následné vyprodukci ceramidů. V případě $\text{TNF}\alpha$ indukované signalizace, je aktivita ASM zvýšena díky aktivačnímu řetězení, které je zprostředkováno kaspázou-7 (Sawada et al., 2002, Edelmann et al., 2011). Bylo prokázáno, že i TRAILem aktivovaná signalizace zvyšuje aktivitu ASM a tím produkci ceramidů (Dumitru & Gulbins, 2006).

Nově vytvořené ceramidy se uvolňují z lyzozomu a v cytoplasmatické membráně vytvářejí specifické domény. Tyto, na ceramidy bohaté části membrány, zřejmě umožňují lepší shlukování receptorů a signalizaci. Exogenní ceramidy, přidané do ASM deficientních splenocytů nebo TRAIL rezistentních buněk, umožní účinnější aktivaci TRAILem indukované apoptózy. Navíc se zdá, že senzitivu k TRAILu může ovlivňovat nejen množství ale i druh ceramidů (Dumitru & Gulbins, 2006, Voelkel-Johnson et al., 2005).

Kromě ASM, ceramidy produkuje ještě neutrální sfingomyelináza (nSMase), která působí v MVB. Vniklé ceramidy formují váčky, které se sekretují ven z buňky (exosomy) (Fang et al., 2007).

Dalším enzymem, který by mohl mít vliv na apoptózu a nachází se v lyzozomu, je kyselá ceramidáza. Její optimální pracovní pH je kolem 5 a katalyzuje přeměnu ceramidů na sfingosin a volné mastné kyseliny (Bernardo et al., 1995). Právě sfingosin dokáže zvyšovat apoptózu díky aktivaci proapoptotických proteinů Bax a Bak a inhibici antiapoptotických Bcl-2 proteinů (Suzuki et al., 2004).

2.4 Internalizace receptorů indukujících apoptózu

Většina membránových receptorů je po navázání ligandu internalizována na klatrinu závislou či nezávislou endocytózou. Endocytóza aktivovaných receptorů slouží k modifikaci či utlumení signalizace. Během endocytózy také může dojít, vlivem sníženého pH v endozomech, k disociaci ligandu a následné recyklaci receptoru. V posledních letech se ukazuje, že receptor může být endocytován i z důvodu posílení signalizace a lepšímu seskupování signálního komplexu (Platta & Stenmark, 2011). Tento druh internalizace má svůj význam i při indukci apoptotických kaskád.

2.4.1 Úloha internalizace receptorů TNF-R1 a FasR

Klatrinem zprostředkovaná internalizace aktivovaného TNF-R1 je významná pro účinnou aktivaci ASM, apoptózy i MAP kinázové signalizace (JNK, Erk, p38), ale nehraje roli při aktivaci NF- κ B (Schutze et al., 1999, Lee et al., 2006b, Woo et al., 2006). Blokováním endocytózy TNF-R1 receptozomu adenovirálním proteinem 14.7K nebo mutací tyrosinového internalizačního motivu nedocházelo k agregaci adaptorových proteinů TRADD a FADD. Byla narušena tvorba DISCu a tím i aktivace kaspázy-8. (Tchikov & Schutze, 2008, Schneider-Brachert et al., 2006, Schneider-Brachert et al., 2004). Vedle neefektivního vzniku DISCu se na potlačení apoptotické signalizace podílel i další mechanismus. Po inhibici internalizace TNF-R1 nedochází k endozomy zprostředkované aktivaci aspartátové proteázy katepsinu D (CTSD). Katepsin D se nachází v Rab5 pozitivních endozomech a podílí se, obdobně jako kaspáza-8, naštěpení a aktivaci proapoptického proteinu Bid a tím i na amplifikaci apoptotické signalizace (Heinrich et al., 2004).

Také Fas/CD95 je po aktivaci internalizován klatrinem zprostředkovanou endocytózou, za pomoci aktinových vláken (Algeciras-Schimnich et al., 2002). Význam internalizace receptoru Fas/CD95 pravděpodobně závisí na buněčném typu. Typ I vykazuje rychlou internalizaci a vysokou hladinou DISCu, zatímco u buněk II. typu je internalizace i množství DISCu nižší. Při sledování endocytické dráhy bylo ověřeno, že zformování DISCu a aktivace kaspázy-8 a -3 vyžaduje internalizaci receptoru u buněčného typu I na rozdíl od buněčného typu II. Aktivovaná kaspáza-8 a FADD vykazovaly kolokalizaci s markery časného endozomu po prvních 10 minutách od indukce apoptózy. Navíc byla při blokaci endocytózy, pomocí siRNA nebo snížením PIP₂, aktivována ve zvýšené míře antiapoptická Erk kinázová signalizace. Je tedy pravděpodobné, že u buněčného typu I, je pro indukci apoptózy skrze Fas receptor potřebná jeho endocytóza (Lee et al., 2006a).

2.4.2 Endocytóza receptorů DR4, DR5 po stimulaci TRAIEm

Role endocytózy v TRAIEm indukované apoptotické signalizaci byla taktéž několika výzkumnými skupinami analyzována, ale výsledky jsou zatím rozporuplné a úloha endocytózy během TRAIEm indukované apoptózy nebyla dosud uspokojivě vysvětlena.

Je prokázáno, že během prvních minut po indukci apoptózy dochází k internalizaci TRAILu spolu s receptory (Akazawa et al., 2009, Kohlhaas et al., 2007, Austin *et al.*, 2006). Avšak zatímco u BJAB buněk (buněčná linie získaná z buněk Burkittova lymfomu) je endocytován DR4 i DR5 (Akazawa et al., 2009), u buněk odvozených od hepatocelulárního karcinomu Huh-7 probíhá internalizace a signalizace spíše skrze DR5 (Kohlhaas et al., 2007). U všech dosavadních experimentů byla pozorována internalizace DR4/5 pomocí klatrinových váčků, avšak i přes zablokování dynaminu-1 u HeLa buněk byl TRAIL i nadále endocytován, což poukazuje na možnost internalizace i pomocí jiných neklatrinových váčků (Kohlhaas et al., 2007, Akazawa et al., 2009, Austin et al., 2006, Zhang & Zhang, 2008, Zhang et al., 2009).

Při zablokování endocytózy aktivovaných TRAIL receptozomů u BJAB buněk (apoptotický typ I) pomocí zvýšené koncentrace extracelulární sacharózy nebylo pozorováno potlačení, ale naopak posílení apoptotické signalizace. Avšak sami autoři přiznávají, že nemohou vyloučit aktivaci jiných proapoptotických drah (např. Src kinázy, generace ROS) v důsledku působení nefyziologického prostředí hypertonické sacharózy. Stejně tak ale nedošlo k inhibici apoptózy při použití dominantně-negativního mutantního dynaminu K44A a to jak u BJAB, tak ani i u HeLa buněk. Věchna tato zjištění vedla autory k závěru, že u BJAB a HeLa buněk není endocytóza TRAILu ani jeho receptorů potřebná k apoptotické signalizaci (Kohlhaas et al., 2007).

Zajímavé je, že výsledky z další publikované práce jsou v určitém rozporu s předcházejícími závěry. Již dříve bylo publikováno, že během TRAIEm indukované apoptózy dochází u buněk hepatocelulárního karcinomu (HCC) a karcinomu žlučovýchodů k lyzozomální permeabilizaci, uvolnění katepsinu B do cytosolu a tím k akceleraci apoptózy (Guicciardi et al., 2007, Werneburg et al., 2007). Při sledování tohoto děje u buněčné linie Huh-7 (ustanovená z HCC) bylo prokázáno, že po snížení exprese DR5 (nikoliv DR4), nedošlo k uvolnění katepsinu B z lyzozomů. Blokování endocytózy v Huh-7 buňkách pomocí exprese mutantního dynaminu vedlo kromě zastavení endocytózy DR4 i DR5 také k potlačení TRAIEm indukované apoptotické signalizace (Akazawa et al., 2009).

V buňkách hepatocelulárního karcinomu (na rozdíl od např. HeLa buněk) je podle autorů endocytóza TRAIL receptozomů nezbytná pro permeabilizaci lyzozomů a uvolnění

proapoptotických katepsinů. Autoři vysvětlují tyto rozdíly dvěma možnými aktivacemi apoptotické signalizace. U typu-D (direct, přímý) není nepotřebná k indukci apoptózy lyzozomální permeabilizace a tudíž ani endocytóza receptorů. U druhého typu-L (lyzozomální), což by mohl být právě případ jaterních HCC buněk, je tato amplifikační lyzozomální smyčka potřebná a je tedy nutná i internalizace receptorů (Akazawa et al., 2009).

Hyperaktivace endocytózy TRAIL receptorů nebo jejich konstitutivní endocytóza může být jednou z příčin rezistence nádorových buněk k TRAIEm indukované apoptóze. Tento mechanismus rezistence k TRAILu byl prokázán u buněčné linie odvozené z karcinomu prsu. Inhibice endocytózy pomocí chlorpromazinu (CPZ) a fenylarsin oxidu (PAO) či snížení exprese AP2 a CHC pomocí siRNA obnovilo povrchovou expresi DR4/5 a tím i citlivost těchto buněk k TRAIEm indukované apoptóze. Za endocytózu DR4 je odpovědný dileucinový motiv v intracelulární části DR. Nadprodukce DR4 s mutovaným internalizačním motivem opět obnovila citlivost těchto buněk k TRAILu. Tímto případem, u buněk epiteliálního karcinomu prsu, je zřejmé, že endocytóza aktivovaných TRAIL receptorů není nezbytná pro účinnou indukci apoptózy (Zhang & Zhang, 2008).

Dosud publikovaná data o úloze endocytózy TRAILových receptozomů nejsou jednoznačná. Pro přesnější interpretaci bude potřeba analýza více buněčných linií a různých podmínek indukce TRAIEm aktivované apoptózy. Pravděpodobně však opět záleží na konkrétním buněčném typu, stejně tak, jako je tomu u endocytózy Fas receptozomu.

3. CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo pomoci objasnit význam endocytózy receptorů DR4 a DR5 během TRAILem indukované apoptózy u buněk kolorektálního karcinomu. Toho jsme chtěli dosáhnout v následujících dílčích krocích:

- Určit typ endocytické dráhy TRAIL receptozomu.
- Zjistit v jakých organelách se TRAIL spolu s receptory po internalizaci nachází.
- Stanovit, jaký vliv má blokáce endocytózy na TRAILem indukovanou apoptózu.

Po objasnění předchozích bodů jsme dále chtěli ověřit, zda některé post-endocytické procesy, jakými je například i acidifikace endozomů a lyzozomů, mohou mít vliv na aktivaci a průběh TRAILem indukované apoptotické signalizace. Tento jev jsme chtěli analyzovat na několika úrovních:

- Zastavit několika různými inhibitory acidifikaci endozomů a lyzozomů a sledovat vliv inhibice na apoptotickou signalizaci.
- Sledovat změny na úrovni asociace DISCu po inhibici acidifikace.
- Případně zjistit mechanismus působení acidifikace na apoptotickou signalizaci.

V neposlední řadě bylo úkolem této diplomové práce získat zkušenosti s aktuálními metodami molekulární biologie a naučit se analyzovat a kriticky hodnotit dosažené výsledky.

4. METODY A MATERIÁLY

4.1 Buněčné linie

Pro všechny naše pokusy byly použity epitelální buněčné linie původně získané z různých stádií a typů lidského kolorektálního karcinomu. Linie DLD-1 a HCT 116 byly izolovány z nádoru a Colo-206F byly získány z nahromaděné břišní tekutiny (ascites fluid). Všechny tyto linie byly zakoupené u firmy *ATCC-LGC Promochem*. Buněčné linie jsou dlouhodobě skladovány v tekutém dusíku (-196 °C) ve speciálních zamrazovacích zkumavkách (*Nunc*) po 1 ml.

4.2 Kultivační média

Buněčná linie HCT 116 byla kultivována v médiu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media). Toto syntetické médium bylo obohaceno o 10 % FBS (*Hyclone*), neesenciální aminokyseliny (*Gibco*) and antibiotika (penicilin - 50 000 IU/l; streptomycin - 0.1 g/l; gentamycin - 0.08g/l; vše *Sigma*).

Linie Colo-206F a DLD-1 byly pěstovány v RPMI (Roswell Park Memorial Institute) médiu s přidáním 10% FBS (*Hyclone*) a antibiotik. Tato média jsou dále uváděna jako běžná, standardní kulturační média.

Pokud byly buňky selektovány po transdukcii virovými vektory (viz kap. 4.10), byl do běžného média přidán puromycin v koncentraci 2µg/ml.

4.3 Udržování buněčných kultur, rozmrazování, zamrazování buněk

Buňky byly pěstovány na standardních Petriho miskách nebo dle potřeby na deskách s jamkami. Během růstu byly ponechány v CO₂ inkubátoru ve standardních kulturačních podmínkách 37 °C a 5% CO₂. Buňky byly vždy zpracovány ve sterilních podmínkách v laminárním boxu. Tyto buněčné linie jsou poměrně nenáročné na kultivaci a proto byly udržované v kultuře vždy přibližně měsíc od rozmrazení a pasážírovány jednou za 2-3 dny dle potřeby. Před pokusem konfluencí buněk dosahovala 70-90%.

Zamrazovány byly čerstvé buňky dle standardního protokolu přibližně pět dní a týden po rozmrazení. Po dosažení konfluencí 90% byly buňky trypsinizovány (1ml Trypsin/EDTA na 10 cm misku) a resuspendovány v běžném kulturačním médiu s přidáním 7% DMSO (*Sigma Aldrich*). Do zamrazovacích zkumavek o objemu 1 ml bylo rozděleno vždy 20% z původního objemu buněk spolu s médiem s DMSO. Nejdříve byly buňky

uloženy ve speciální zamrazovací nádobě s isopropanolem do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po jednom dni byly přemístěny do tekutého dusíku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). K rozmrazení docházelo ve vodní lázni při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté byly resuspendovány v 5ml teplého standardního média a ponechány 15 minut v inkubátoru. Následně se buňky centrifugovaly při $80\text{-}100 \times g$ (*Centrifuge 5810 Eppendorf, Germany*) po dobu 5 minut, aby bylo možné odstát médium s DMSO. Nakonec se přendaly na misku do čerstvého, ohřátého média. Před prvním pokusem byly nové buňky kultivovány alespoň 4 dny v CO_2 inkubátoru.

4.4 Použití chemikálie a značení rekombinantního TRAILu

Pro indukci apoptózy byl použit lidský rekombinantní TRAIL (95-281 AA, *Apronex*) a to vždy v koncentraci 200ng/ml. TRAIL byl dlouhodobě skladován při koncentraci 1mg/ml v malých objemech v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před použitím byl TRAIL naředěn do buněčného média a přidán v daných časech přímo do misky/jamky

Pro účely precipitace DISCu byl použit TRAIL konjugovaný s biotinem. Biotinylovaný TRAIL (bio-TRAIL) byl připraven v naší laboratoři navázáním biotinu (NHS-PEQ4-Biotin, *Pierce*) na rekombinantní TRAIL. Koncentrace bio-TRAILu přidávaného na buňky byla 1 $\mu\text{g/ml}$. Byl skladován opět při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Rekombinantní TRAIL byl též modifikován podle instrukcí výrobce fluorescenční probou Alexa 647 (Alexa Fluor 647 carboxylic acid, succinimidyl ester, *Molecular probes*). Tento fluorescenčně značený TRAIL-Alexa 647 byl použit pro sledování endocytózy TRAILu za využití konfokální mikroskopie. TRAIL-Alexa 647 byl přidán na buňky rostoucí na sklíčkách (viz kap. 4.6) v požadovaných časech. Výsledná koncentrace v médiu byla 200 ng/ml. Před použitím byl TRAIL testován na schopnost indukce apoptózy, která byla srovnatelná s nemodifikovaným TRAIlem.

Pro inhibici endocytózy byl použit dynasore (*Sigma Aldrich*), což je specifický inhibitor dynaminu1, dynaminu2 a mitochondriálního dynaminu Drp1, avšak nepůsobí na jiné malé GTPázy. Dynasore byl používán ve finální 36 μM koncentraci a jeho koncentrovaný roztok (10 mM) byl skladován při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

K inhibici acidifikace jsme použili dva inhibitory V-ATPázy – bafilomycin A1 (baf A1), concanamycin A (CCA) a také lyzomotropické antibiotikum chloroquine (CHQ) (vše *Sigma Aldrich*). Všechna činidla snižují pH v lyzozomech a endozomech. Tyto chemikálie byly rozpuštěny v DMSO a uchovávány v menších objemech dlouhodobě při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a krátkodobě v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5 Detekce a kvantifikace apoptotických buněk pomocí průtokové cytometrie

4.5.1 Stanovení aktivity kaspázy-3 použitím protilátky M30-FITC

Pro detekci apoptotických buněk pomocí průtokové cytometrie byla použita protilátka M30-FITC (*Enzo LS*). Tato protilátka rozpoznává epitop kaspázy-3 řezaného cytokeratinu 18. Díky této specifitě můžeme odlišit buňky, které mají aktivovanou kaspázu-3, což je typický průvodní znak probíhající apoptózy.

Buňky byly pěstovány na 24-jamkové desce tak, aby dosáhly přibližně 80% konfluence. Do média byl přidán TRAIL, případně inhibitory (dynasore, CCA apod.), které jsme nechali působit potřebnou dobu při 37 °C. Poté byly buňky 2x omyty chladným PBS, inkubovány 10 minut s trypsinem/EDTA a přeneseny do 96-jamkové desky určené pro průtokovou cytometrii. Celou dobu před fixací byla deska s buňkami držena na ledu. Po centrifugaci a omytí chladným PBS byly buňky fixovány methanolem po dobu 30 minut při -20 °C. Následně byly fixované buňky 2x omyty chladným PBS s přísadkou 0,5% BSA proti nespecifické vazbě protilátky. Poté se do každé jamky přidala protilátka M30-FITC (*Apronex*) do finální koncentrace 1 µg/ml. Buňky byly ponechány zakryté 45 minut při pokojové teplotě (RT). Nabarvené buňky byly opět omyty PBS a centrifugovány. Ve všech krocích se buňky vždy centrifugují za těchto podmínek - 250 x g, 5 minut, 4 °C. Na závěr se buňky resuspendují v 50 µl PBS a analyzují pomocí průtokové cytometrie (průtokový cytometr LSRII - *BD Boisciences*). Získaná data byla následně vyhodnocena pomocí softwaru FlowJo (*TreeStar*).

4.5.2 Detekce aktivované kaspázy 8

Pro kvantifikaci aktivované, řezané kaspázy 8 (p43/41 a p18 fragmenty) jsme též využili průtokové cytometrie. Buňky byly pěstovány a inkubovány s chemikáliemi stejně jako pro barvení M30-FITC protilátkou. Po působení TRAILu a odsátí média jsme buňky za stálého uchování na ledu opláchnuli a inkubovali s Trypsinem/EDTA po dobu 10 minut při 37 °C. Poté byly fixovány 3% paraformaldehydem (PFA) po dobu 10 minut při 37 °C. Následně byly přemístěny na led a k paraformaldehydu byl po 1 minutě přidán ledový methanol do finální koncentrace 90% methanolu a buňky byly ponechány 30 minut na ledu. Následovalo 2x omytí PBS a blokáce epitopů proti nespecifické interakci s protilátkou pomocí 0,5% BSA v PBS po dobu 10 minut. Dále byly buňky inkubovány (30 min., RT) s primární králičí protilátkou proti řezané formě kaspázy-8 (18C8, *Cell Signaling*). Následovalo omytí a inkubace ve tmě se sekundární protilátkou (GAM- Alexa Fluor® 488,

Invitrogen) po dobu 30 minut. Vzorky se na závěr omyly a resuspendovaly v PBS. Mezi jednotlivými kroky se buňky centrifugují 5 minut, při 4 °C na 250 x g. Vzorky byly opět analyzovány pomocí průtokové cytometrie (viz kap. 4.5.1).

4.6 Konfokální mikroskopie

Před nasazením buněk na 24-jamkovou desku bylo na dno každé jamky přidáno krycí sklíčko, na které byly buňky den a dva před pokusem nasazeny. Po dosažení 90% konfluence byly k buňkám do média přidány požadované látky a také barvený TRAIL-A647. Po inkubaci s chemikáliemi byly buňky zpracovány dle následujících postupů a analyzovány konfokálním mikroskopem Leica TCS SP5.

4.6.1 Detekce buněčných proteinů a struktur metodou imunofluorescence

Buňky byly pěstovány na krycím sklíčku v 24-jamkové desce ve standardním médiu. Po odsátí a promytí byly buňky fixovány 3% paraformaldehydem v PBS po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Následně byly buňky permeabilizovány 0,3% Tritonem X-100 v PBS (5 minut, RT) a 3x omyty PBS. Proti nespecifické vazbě protilátky se buňky inkubovaly 15 minut při pokojové teplotě v 1%BSA v PBS. Po omytí byla sklíčka ponechána 45 minut s primární protilátkou naředěnou v 1% BSA v PBS. Buňky byly 3x promyty PBS a poté 45 minut inkubovány ve tmě s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou. Použité protilátky jsou uvedené v **tabulce 4.6.1** a byly aplikovány v koncentracích doporučených výrobcem. Na závěr se buňky 2x omyly v PBS a při třetím omytí bylo do PBS přidáno DAPI (1,25 μM) nebo Hoechst 34580 (1μM) (*Invitrogen*). Po 15 minutách byly buňky naposledy 2x promyty PBS. Sklíčka byla namontována na podložní skla pomocí montovacího roztoku ProLog Gold antifade reagent (*Invitrogen*), přes noc ponechána v temnu pro zaschnutí a poté analyzována pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie.

Primární protilátka proti:	Typ, katalogové číslo	Dodavatel
EEA1-endozom	myš, 610456	<i>BD Trans Lab</i>
LAMP3-lyzozom	myš	<i>laboratoř prof. Hořejšího</i>
GM130 - Golgiho aparát	myš, 35/GM130	<i>BD Trans Lab</i>
caveolin-1	králíčí, N-20	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
člěpená kaspáza-8	králíčí, 18C8	<i>Cell Signaling</i>
Sekundární protilátka proti:	Typ	Dodavatel
myším protilátkám	kozí, konjugovaná s Alexa 488, 547	<i>Molecular Probes</i>
králíčím protilátkám	kozí, konjugovaná s Alexa 488, 547	<i>Molecular Probes</i>

Tabulka 4.6.1 Protilátky použité pro detekci konfokálním mikroskopem

4.6.2 Lokalizace buněčných kompartmentů pomocí fluorescenčních prób

Pro značení organel s kyselým pH byl použit LysoTracker (LysoTracker Green DND-26, *Invitrogen*) a pro detekci mitochondrií MiToTracker (MitoTracker Red CMXRos, *Invitrogen*). Tyto fluorescenční próby mohou pasivně procházet skrz buněčnou membránu, nemusí být tak použit Triton X-100 pro permeabilizaci membrány. Obě látky byly použité dle návodu výrobce. Nejdříve byly buňky, rostoucí na sklíčku, inkubovány danou dobu s TRAILem-A647 při 37 °C. Následně byla přidána odpovídající próba v doporučených koncentracích a ponechána na buňkách 30 minut při 37 °C. Po této době bylo médium vyměněno a pokud byly buňky dále barvené pomocí fluorescenčních protilátek, následný postup byl stejný jako při pouhém barvení protilátkou (viz kapitola 4.6.1). Při jednoduchém barvení byly buňky fixovány 3% PFA po dobu 15 min při RT. Po opláchnutí bylo značeno buněčné jádro pomocí Hoechstu 34580 (*Invitrogen*), který vstoupí do buněk i bez permeabilizované membrány. Skla byla montována stejným způsobem jako při použití protilátek.

Fluorescenčně značený transferin (Transferrin From Human Serum, Alexa Fluor® 594 conjugate, *Invitrogen*) byl používán k detekci a sledování klatrinem zprostředkované endocytózy. Po aplikaci se váže na transferinové receptory stejně jako normální nebarvený transferin. Pokud bylo potřeba, buňky byly standardně inkubovány s chemikáliemi (např. dynasore) a poté byl do média k buňkám přidán transferin-A594 (0,5 µg/ml). Inkubace probíhala v CO₂ inkubátoru při 37 °C. Následně byly buňky omyty 2x PBS a fixovány 3% PFA. Buněčné jádro bylo vizualizováno pomocí barvení Hoechstem 34580.

4.7 Inhibice endocytózy a acidifikace

Inhibitor endocytózy dynasore byl nejdříve testován na její optimální účinnou koncentraci a případnou toxicitu. Nejníže možná inhibiční koncentrace bez vedlejšího vlivu byla pro naše buňky stanovena na 36 µM. Dále byla testována potřebná doba pro inhibici endocytózy. Zjistili jsme, že 30 minut preinkubace buněk s inhibitorem postačuje k účinné blokaci endocytózy.

Obdobně byly i testovány i inhibitory V-ATPázy a acidifikace. Jejich optimální inhibiční koncentrace byly: bafilomycin A1 - 20 nM, concanamycin A - 20 nM, chloroquine- 50 µM a standardně jsme s nimi cílové buňky preinkubovali 30 minut (bafA1, CCA) a

1 hodinu (CHQ) před vlastním přidáním TRAILu. Inhibitory byly bezprostředně před pokusem naředěny do média a ponechány s buňkami po celou dobu pokusu ve 37 °C.

4.8 SDS-PAGE, western blotting, imunodetekce proteinů

Buňky byly nasazeny do 24-jamkové desky a napěstovány na přibližně 80% konfluenci. K buňkám byly přidány potřebné chemikálie a po inkubaci bylo odmyto kultivační médium, buňky byly 2x opláchnuty studeným PBS a následně lyzovány ve 100 µl SDS vzorkovém pufru. Celý obsah jamky byl pomocí centrifugace přefiltrován přes pipetovou špičku s filtrem pro odstranění DNA a ponechán 2 minuty v 95 °C. Dělicí gel měl 12% obsah akrylamidu a byl připraven dle rozpisu uvedeného v kapitole 3.11. Po zatuhnutí dělicího gelu byl převrstven 5% gelem zaostřovacím, do kterého byl vložen plastový hřeben. Po zpolymerování zaostřovacího gelu byly vzorky (15-25 µl) injekční stříkačkou zavedeny do jamek v 5% gelu a gel byl zalit a naplněn SDS elektrodočkovým pufrům. Elektroforéza probíhala prvních 10-15 minut při napětí 80 V a po další hodinu bylo napětí zvýšeno na 150 V.

Po proběhlé elektroforéze byl gel ponechán 15 minut v pufru pro blotting a poté se gel opatrně přemístil na nitrocelulózovou membránu (Hybond-ECL, *GE Healthcare*), taktéž zvlhčenou v blokovacím pufru. Gel s membránou se vložily mezi dva blokovací pufrům nasáklé filtrační papíry o stejných rozměrech jako membrána s gelem. Přenášení proteinů probíhalo 85 minut při konstantním proudu 0,8 mA na cm². Po skončení přenosu proteinů byla membrána omyta v PBS-Tween pufru, obarvena roztokem Ponceau S (azobarvivo) pro zjištění úspěšnosti blotování. Následovala blokáce membrány v 5% mléce v PBS po dobu 15 minut. Membrána byla poté uložena do -20 °C pro další použití.

Pro detekci proteinů přenesených na membránu byla použita metoda detekce protilátkami. Primární protilátka se rozředí v 1% mléce v PBS-Tween do požadované koncentrace dle protokolu od dodavatele. Membrána se s protilátkou inkubuje za stálého kýchání při pokojové teplotě (RT) po 45 minut. Poté se 3x omyje v PBS-Tween pufru a následně se inkubuje 45 minut, při RT se sekundární protilátkou, taktéž rozpuštěnou v 1% mléce v PBS-Tween. Sekundární protilátka je konjugovaná s křenovou peroxidázou pro vizualizaci navázané protilátky. Po opětovném promytí se membrána inkubuje 5 minut v chemiluminescenčním roztoku, obsahující peroxid vodíku SuperSignal West Nano (*Pierce*). Signál z detekovaných proteinů byl zaznamenán na rentgenový film (*Kodak*). Použité primární protilátky jsou uvedeny v **tabulce 4.8.3**.

Primární protilátka proti:	Typ, katalogové číslo	Dodavatel
kaspáza-3	myš, 31A1067	<i>Alexis</i>
kaspáza-8	králíčí, 559932	<i>BD Pharmigen</i>
kaspáza-8	myš, 12F5	<i>ENZO LS</i>
kaspáza-10	myš, 4C1	<i>MBL</i>
cFLIP	myš, NF-6	<i>Alexis</i>
TRAF2	myš, C90-481	<i>BD Pharmigen</i>
FADD	myš, 1/FADD	<i>BD Transduction Lab.</i>
DR5	králíčí, D3938	<i>Sigma-Aldrich</i>
klatrin	myš, 610499	<i>BD Transduction Lab.</i>
adaptorový protein 2	Myš, 610	<i>BD Transduction Lab.</i>
cdc-42	myš, 610928	<i>BD Transduction Lab.</i>
caveolin-1	králíčí, N-20	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
actin	kozí, C-11	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
α tubulin	myš, TU-01	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
řěpená kaspáza 8	králíčí, 18C8	<i>Cell Signaling</i>
Sekundární protilátka proti:	Typ	Dodavatel
myším protilátkám	kozí, konjugovaná s peroxidázou	<i>Jackson immunoresearch</i>
králíčím protilátkám	kozí, konjugovaná s peroxidázou	<i>Jackson immunoresearch</i>

Tabulka 4.8.3 Protilátky použité pro detekci proteinů na nitrocelulózové membráně

4.9 Precipitace TRAIL-receptor-DISC komplexu

Buňkám narostlým na Petriho misce do 80% konfluence jsme po inkubaci s inhibitory vyměnili médium za ledově chladné a přidali biotinylovaný TRAIL (viz kapitola 4.4) v koncentraci 1 μ g/ml. Nechali jsme TRAIL-biotin navázat na receptory na ledu po dobu 15 minut. Poté jsme vyměnili médium za teplé (37 °C), opět s přídatkem potřebných inhibitorů (bez TRAILu) a buňky byly ponechány pokračovanou dobu v CO₂ inkubátoru. Vždy po uplynutí časového bodu jsme buňky omyli a sekrábali do studeného PBS. Buňky se následně centrifugovaly (250 x g, 4 °C, 5 minut) a po přidání 500 μ l lyzačního pufru k peletě se ponechaly 30 min. lyzovat na ledu. Centrifugací (16000 x g, 30 min., 4 °C) jsme pak odstranili zbytky buněk a buněčná jádra. Pro kontrolu koncentrace proteinů a další analýzu bylo odebráno z každého vzorku 50 μ l celkového lyzátu (CL). Koncentraci proteinů v CL jsme zjistily pomocí Bradfordova činidla a zjištěnou koncentraci jsme pak použili pro standardizaci nanátek. Upravili jsme objem nanátky tak, aby bylo přidáno stejného množství proteinů v CL k 20 μ l streptavidinových kuliček (Streptavidine-Sepharosa, Pierce). Na kuličky bylo naneseno obvykle 400 μ l lyzátu. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 4 °C, za

neustálé rotace. Kuličky s navázaným TRAIL-DISC komplexem byly 5 minut omývány v lyzačním pufru, stočeny (2min., 4 °C, 400 x g) a toto promývání bylo celkem 5x zopakováno. Poté byl k promytým kuličkám přidán SDS vzorkový pufr (100 µl) a vzorky byly inkubovány 15 min při 95 °C. Tím došlo k oddělení precipitovaného komplexu. Streptavidinové kuličky byly následně odstraněny centrifugací vzorků skrze píčky s filtrem a vzorky byly analyzovány pomocí western blottingu (viz kap. 4.8).

4.10 RNA interference

4.10.1 Snížení exprese proteinů pomocí siRNA

Pro inhibici endocytických drah jsme použili metodu RNA interference, kdy se po transfekci siRNA do buňky snižuje hladina cílových mRNA a tím i proteinů. Buňky byly pěstovány na 24-jamkové desce do konfluence přibližně 25%. Aby byla zvýšena účinnost transfekce vyměnili jsme běžné médium za 400 µl média Opti-MEM (*Invitrogen*), což je speciální bezsérové médium určené pro transfekci. Pro všechny siRNA jsme připravili dvě různé výsledné koncentrace siRNA - 30 nM (1,5 µl siRNA ze zásobního 10 µM roztoku) a 90 nM (4,5 µl siRNA z 10 µM roztoku). Pro každou jamku jsme si namíchali dvě následující reakční směsi:

a) 50 ml Opti-MEM + 1,5 nebo 4,5 µl siRNA (**Tab. 4.10.1**)

b) 50 ml Opti-MEM + 1 µl transfekční činidlo Lipofectamine RNAiMAX (*Invitrogen*)

Po 5 minutách při RT jsme smíchali směsi a) a b) dohromady a nechali dalších 20 minut při RT. Smíchanou reakční směs jsme přidali na buňky a ponechali 4 hodiny při 37 °C. Po 4 hodinách jsme OptiMEM vyměnili za běžné médium a inkubovali dalších 48 hodin při 37 °C. Snížení exprese cílového proteinu v lyzátech transfekovaných buněk bylo ověřeno pomocí western blottingu.

Cílová RNA	Sekvence (5'→3')	Dodavatel	Zdroj
CHC2 - velký řetězec klatrinu 2	UAAUCCAAUUCGAAGACCAAU	<i>Dharmacon, Inc</i>	(Motley <i>et al.</i> , 2003)
AP2µ2 - adaptový protein 2µ2	AAGUGGAUGCCUUUCGGGUCA	<i>Dharmacon, Inc</i>	(Motley <i>et al.</i> , 2003)
Caveolin 1	AAAUACAAGAUCUCCUCCU	<i>Dharmacon, Inc</i>	(Cordes <i>et al.</i> , 2007)
Cdc 42	AAGATAACTCACCCTGTCCA	<i>Dharmacon, Inc</i>	(Tatin <i>et al.</i> , 2006)
siKO-kontrolní siRNA	Silence® Negative Control No. 1	<i>Invitrogen/Ambion</i>	

Tabulka 4.10.1 Použití siRNA pro inhibici endocytických drah

4.10.2 Transdukce buněk lentivirovými vektory pro expresi shRNA

Transdukce lentivirálního vektoru p.LKO1 (*Sigma-Aldrich*) nesoucího sekvenci pro umlčení proteinu cFLIP (**Tab. 4.10.2**), byla provedena Mgr. Janem Braňnou, dle protokolu doporučeného firmou Sigma-Aldrich. Transdukovány byly linie DLD-1 a Colo-206F. Avšak buňky Colo-206F vykazovaly po transdukci morfologické změny, proto byla udržována pouze linie DLD-1.

K buňkám bylo přidáno 2 dny po transdukci selekční antibiotikum puromycin v koncentraci 3 μg na 1 ml média. Buňky byly selektovány po dobu 4 dnů a z nich připravené buněčné lyzáty byly analyzovány pomocí western blottingu pro ověření snížení exprese proteinu cFLIP (**Obr. 5.8 A**). Buňky byly nadále udržovány pod stálou puromycinovou selekcí (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Jako kontrola byly připraveny buňky nesoucí vektor p.LKO1 obsahující sekvenci, která nesnížuje expresi žádného proteinu (non-silencing shRNA) (**Tab. 4.10.2**).

shRNA	Sekvence (5'→3')
kontrolní (non-silencing)	CAACAAGATGAAGAGCACCAA
cFLIP-sh1	CCTCACCTTGTTCGGACTA
cFLIP-sh2	GCTCCATAATGGGAGAAGTAA

Tabulka 4.10.2 Sekvence shRNA pro snížení exprese proteinu cFLIP

4.11 Použití roztoky

- **PBS 10x koncentrovaný**

NaCl	10 g
KCl	0,25 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
H ₂ O doplnit do	100 ml

- **PBS 1x koncentrovaný**

PBS 10x koncentrát	10 ml
H ₂ O	90 ml

- **1x SDS vzorkový pufr, redukující**

1x 50 mM Tris/HCl, pH 6.8
2% SDS
100 mM DTT
5% glycerol
0.002% Bromfenolová modř

- **1x SDS elektrodový pufr**

Glycin	144 g
SDS	10 g
Tris	30 g
H ₂ O doplnit do	1000 ml

- **1x pufr pro western blotting**

Methanol	200 ml
10x koncentrát (0,25 M Tris, 1,92 M glycin)	40 ml
H ₂ O	760 ml

- **PBS-Tween pufr**

10x PBS	2 l
Tween 20	10 ml
H ₂ O	18 l

- **1x lyzační pufr, pH 7,5**

1% NP40
20 mM Tris
50mM NaCl
10% glycerol
10mM EDTA
1x Complete protease inhibitor cocktail (*Roche*)

- **12% gel pro SDS-PAGE** □na 2 gely

H ₂ O	4,25 ml
Tris, pH 8,8	2,5 ml
40% akrylamid	3 ml
10% SDS	0,1 ml
APS	0,1 ml
TEMED	10 μl

- **5% zaostřovací gel** □na 2 gely

H ₂ O	3 ml
Tris, pH 6,8	1,25 ml
40% akrylamid	0,63 ml
10% SDS	0,05 ml
APS	0,05 ml
TEMED	5 μl

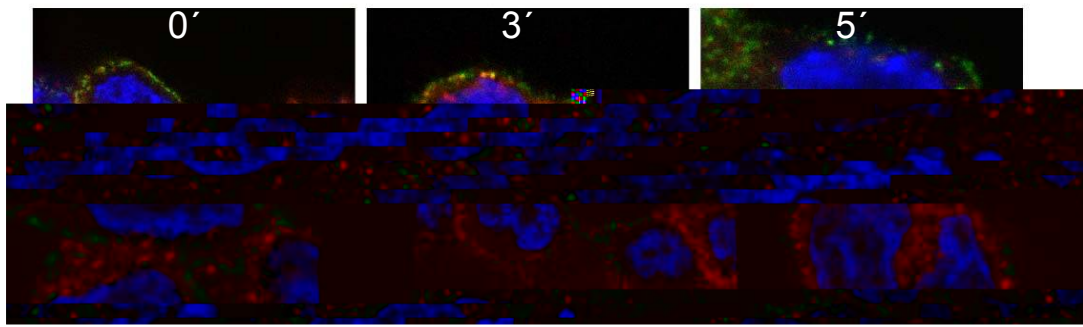
5. VÝSLEDKY

5.1 Analýza endocytózy TRAILem aktivovaných receptozomů

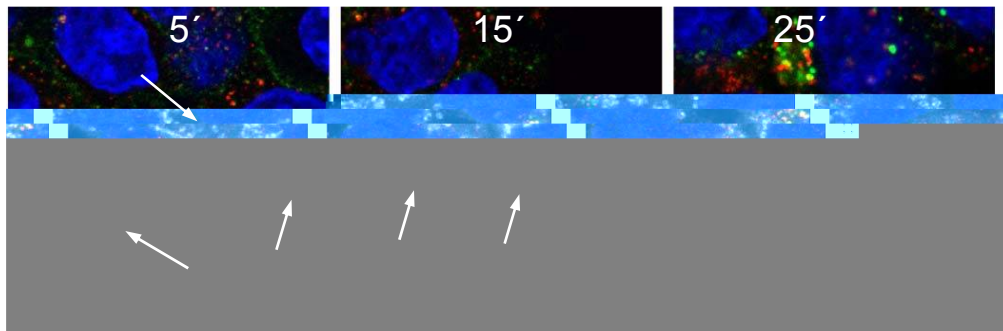
Doposud publikovaná data ukazují, že TRAIL receptozomy (tj. váčky obsahující TRAIL-receptorové komplexy) jsou endocytovány pomocí klatrinem zprostředkované endocytózy (Akazawa et al., 2009, Kohlhaas et al., 2007, Zhang & Zhang, 2008). Není ale zcela vyloučena, jak je naznačeno v článku publikovaném Kohlhaas a spol., na klatrinu nezávislá endocytóza TRAILových receptozomů (Kohlhaas et al., 2007). Pro ověření typu endocytické dráhy TRAILu u našich modelových buněčných linií a jsme použili jak marker charakteristický pro klatrinovou dráhu – fluorescenčně značený protein transferin-A647, tak protilátku proti caveolinu-1, proteinu účastnícího se na klatrinu nezávislé dráhy. Pro analýzu další dráhy receptozomu byly použity protilátky proti antigenu časného endozomu (EEA1), Golgiho komplexu (GM130), MitoTracker (označení mitochondrií) a LysoTracker (marker pro lyzozomy). Apoptóza byla indukovaná pomocí fluorescenčně značeného TRAILu-Alexa 647 a sledována protilátkou rozpoznávající aktivní kaspázu-8.

Již od navázání TRAILu na receptory u modelové kolorektální linie HCT 116 jsme pozorovali kolokalizaci s transferinem (**Obr. 5.1 A, 0'**), která byla zřetelně viditelná během počáteční fáze apoptózy. Během prvních minut od aplikace se TRAIL nacházel v časných endozomech, což dokazuje kolokalizace s markerem EEA1 (**Obr. 5.1 B**). Naopak jsme nepozorovali žádnou kolokalizaci TRAILu s caveolinem-1, ani s Golgiho komplexem nebo s mitochondriemi (**Obr. 5.1 C, D, E**). Aktivovaná kaspáza-8 se během endocytózy nacházela velice blízko TRAILu, což značí, že v blízkosti TRAIL receptozomů dochází k účinné aktivaci kaspázy-8. (**Obr. 5.D**). Lehce sporná zůstává závěrečná fáze spojení endozomu s lyzozomem. Zdá se, že TRAIL se do lyzozomů dostává až v pozdější fázi apoptózy (60. – 120. minuta), což nám potvrdila i kolokalizace s dalším lyzozomálním markerem LAMP-3 (viz kapitola 5.9). Po tomto pozorování můžeme říci, že TRAIL i jeho receptory jsou endocytovány klatrinovou dráhou a že během endozomální dráhy dochází k aktivaci kaspázy-8.

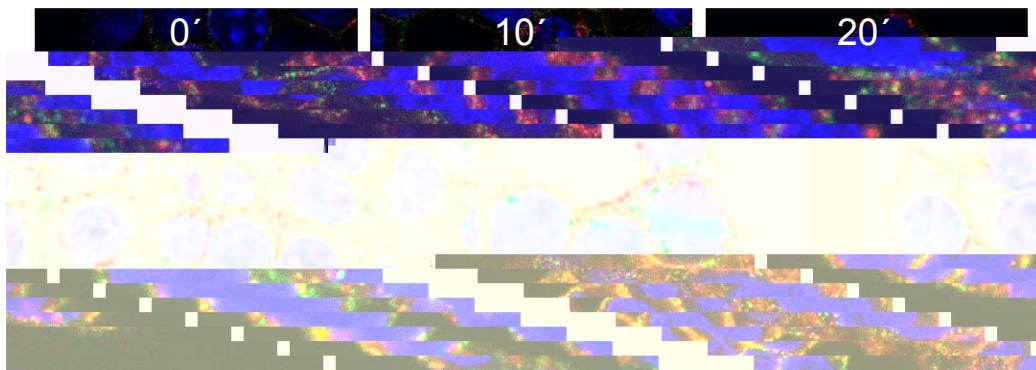
A) Transferrin



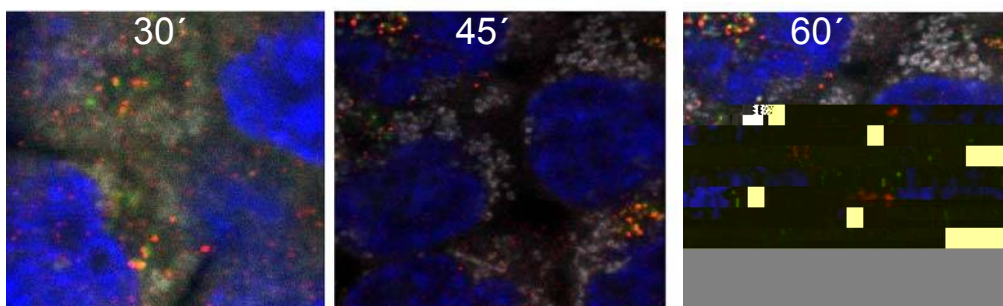
B) EEA1 □ časný endozom



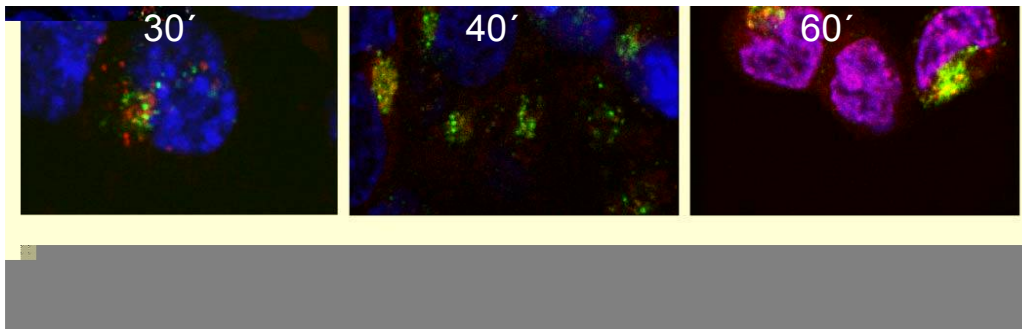
C) Caveolin - 1



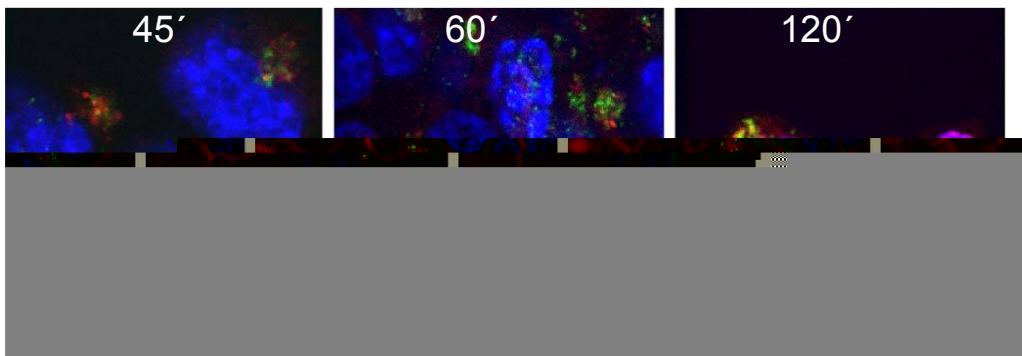
D) MitoTracker, aktivovaná kaspáza 8



E) GM130 - Golgi



F) LysoTracker



Obrázek 5.1 Iniclace a průběh endocytózy TRAIL receptozomů. HCT 116 buňky byly, po inkubaci s fluorescenčně značeným TRAILem-Alexa 647 a/nebo transferinem Alexa 647, fixovány a barveny dalšími markery specifických organel. Pozorovali jsme zřetelnou kolokalizaci TRAILu s transferinem A0'-A5'. V další fázi endocytózy (mezi 15-30 min) TRAIL kolokalizoval s markerem časných endozomů (EEA1) - B5', B15'. V pozdní fázi apoptózy jsme zaznamenali lokalizaci TRAILu v lyzosomech F60', F120'. S dalšími organelami (mitochondrie D, Golgiho aparát E) nebyla zjištěna žádná kolokalizace. Stejně tak není viditelná souvislost mezi internalizací TRAILu a caveolinovým typem endocytózy C. Jádra byla barvená DAPI/Hoechst 33540 modrá, jednotlivé sub-buněčné markery červená, TRAIL-Alexa647 zelená, mitochondrie červená.

5.2 Ověření typu endocytické dráhy TRAIL receptozomu

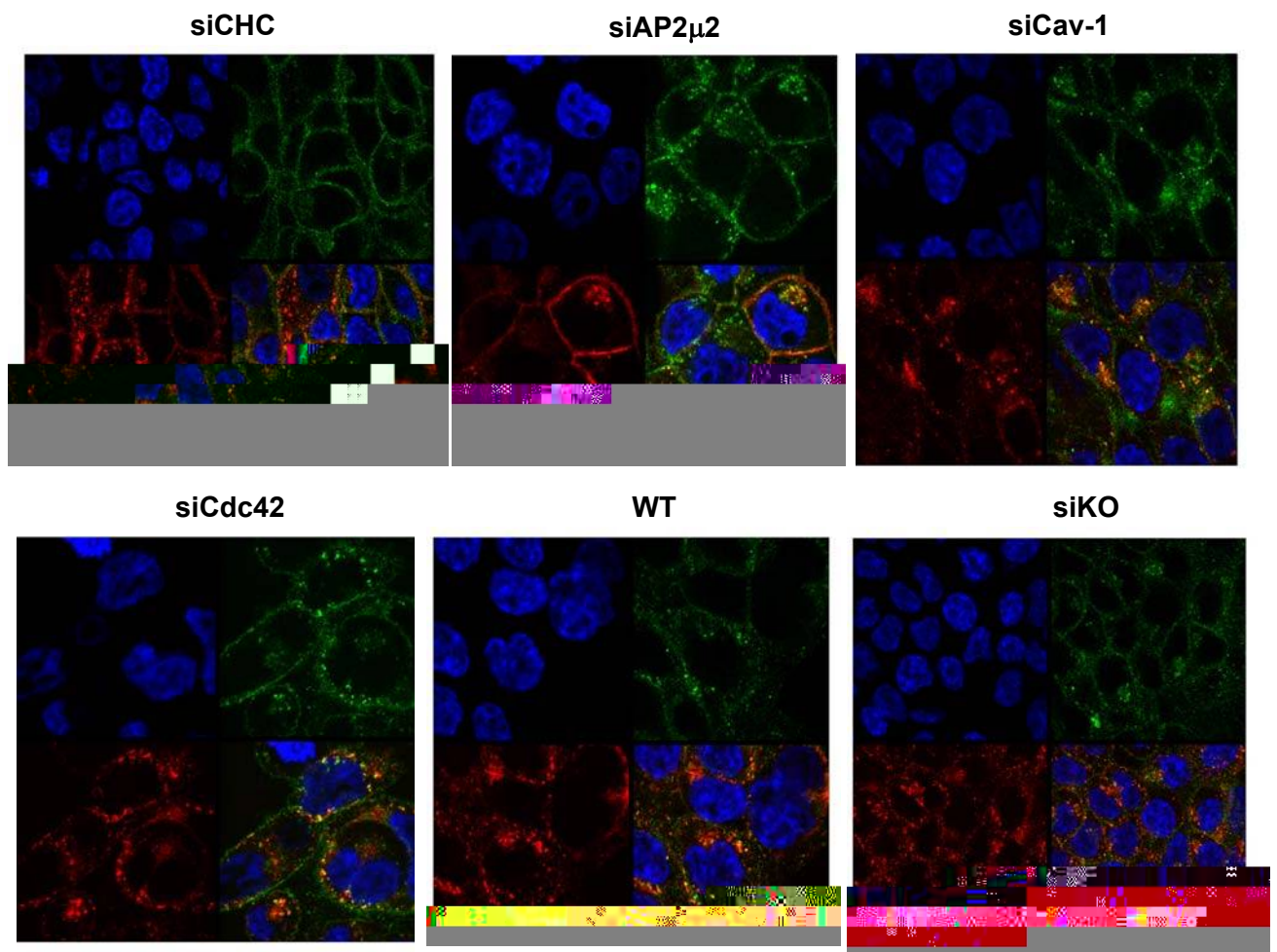
Pro ověření endocytózy TRAIL receptozomů jsme pomocí siRNA potlačili expresi esenciálních genů, které se účastní na klatrinu závislých i nezávislých endocytických drah, v buněčné linii DLD-1. Následně jsme analyzovali vliv snížené exprese na endocytózu fluorescenčně značeného TRAILu (TRAIL receptozomů). Použili jsme siRNA proti těžkému řetězci klatrinu (CHC) a μ podjednotce adaptorového proteinu 2 (AP2). Dále byly aplikovány dvě siRNA snižující expresi proteinů jiných než klatrinových drah, proti caveolinu-1 a cdc42. Cdc42 je malá GTPáza z rodiny Rho, která se také účastní endocytózy, ale ne skrze klatrinovou dráhu (Lamaze et al., 1996). Jako kontrola byla použita vlásenka, jejíž sekvence není podobná žádné myš, krysí ani lidské RNA (siKO). Neměla by tedy mít žádný efekt na

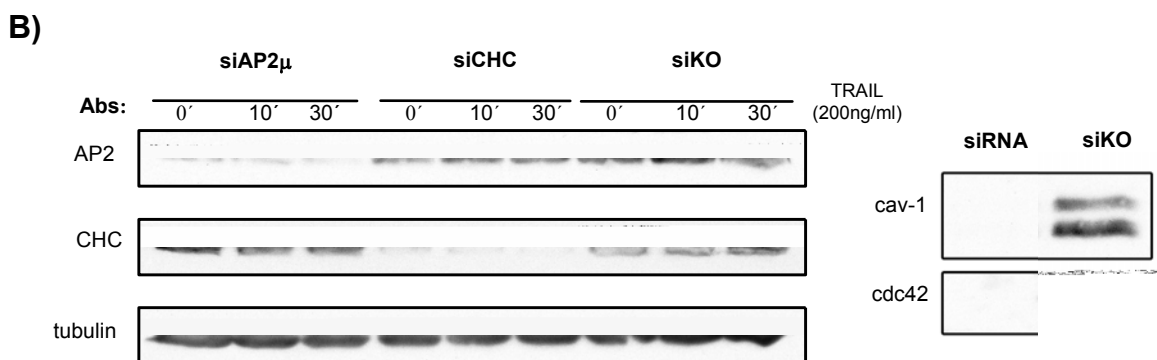
cílové buňky. Jako další kontrola posloužily normální netransfekované buňky (WT). Potlačení exprese jednotlivých cílových genů, resp. jejich proteinových produktů jsme si nejprve ověřili pomocí western blottingu (**Obr. 5.2 B**). Zjistili jsme, že všechny použité siRNA účinně potlačovaly expresi cílových genů.

Podle našich předpokladů k největší blokaci transferinu-A647 i TRAILu-A647 došlo u buněk, které byly transfekované siCHC. Lehká blokáce internalizace nastala i u siAP2 μ 2. U kontrolní siRNA, netransferovaných buněk ani u dalších dvou siRNA nedošlo dle očekávání k blokaci internalizace TRAILu ani transferinu (**Obr. 5.2 A**). TRAIL receptozomy jsou tedy endocytovány v našich modelových kolorektálních buněčných liniích mechanismem závislým na klatrinu a ne endocytózou využívající caveolin-1 či cdc42.

A)

TRAIL-A647 , Tf-A594 , DAPI



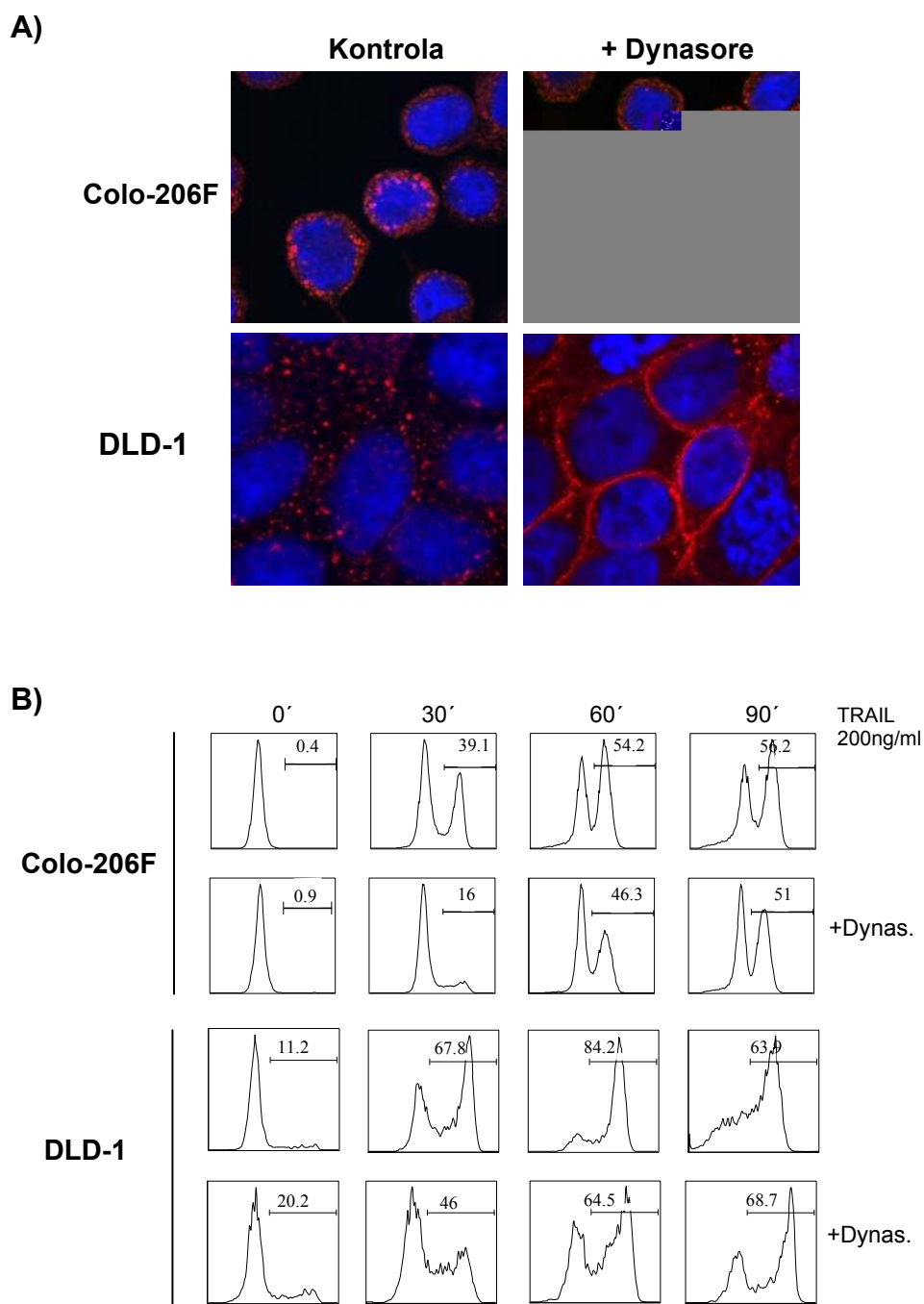


Obrázek 5.2 Inhibice internalizace TRAIL receptozomů pomocí siRNA. DLD-1 buňky byly transfekované indikovanými siRNA dle příslušného protokolu a dále analyzovány **A)** Po transfekci siCHC a siAP2 μ došlo k inhibici internalizace transferinu i TRAILu. U dalších použitých siRNA (proti caveolinu-1 a cdc42) k žádným změnám vůči kontrolní siRNA ani vůči netransferovaným buňkám nedošlo. Pro vizualizaci jsme použili TRAIL-Alexa647 - zelená, Transferin-Alexa594 - červená, DAPI (jádra)-modrá. **B)** Ověření snížení exprese cílových genů pomocí western blottingu. U všech siRNA došlo ke snížení cílového proteinu, na rozdíl od kontrolní vlásenky (siKO), kde zůstala exprese nezměněna.

5.3 Inhibice na dynaminu závislé endocytózy a její vliv na TRAILem indukovanou apoptózu

U endocytických váčků, které jsou odštěpovány za účasti dynaminu (klatrinové a caveolinové), jsme zablokovali oddělování od membrány pomocí dynasoru, specifického inhibitoru GTPázy dynaminu. Účinek takto specifické blokace byl testován na modelových DLD-1 a na Colo-206F buňkách. Dynasore byl přidán k buněčné kultuře 30 minut před aplikací TRAILu v koncentraci 36 μ M a ponechán po celou dobu působení TRAILu, tzn. dalších 90 minut.

Po aplikaci dynasoru jsme zřetelně pozorovali inhibici internalizace transferinu konjugovaného s Alexou 594 u obou dvou linií (**Obr. 5.3 A**). Poté jsme testovali vliv inhibice dynaminu na TRAILem indukovanou aktivaci kaspázy-3. Buňky byly značeny fluorescenčně značenou protilátkou M30-FITC rozpoznávající epitop kaspázou-3 štěpeného cytokeratinu 18 a analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Akumulace tohoto fragmentu přímo odpovídá hladině aktivované kaspázy-3. Opakovaně se potvrdilo, že inhibice na dynaminu závislé endocytózy má za následek výrazné, byť dočasné zpomalení aktivace kaspázy-3 a to zejména v časně fázi apoptózy. V pozdějších fázích se tento rozdíl pozvolna vyrovnává (**Obr. 5.3 B**).



Obrázek 5.3 Vliv inhibice dynaminu na aktivitu kaspázy-3. **A)** Po použití inhibitoru dynaminu-dynasoru (30 minut, 36 μ M) byl transferin-Alexa594 lokalizován na membráně a nedocházelo u DLD-1 ani u Colo-206F k jeho internalizaci. U buněk neinkubovaných s dynasorem se transferin nacházel v cytoplasmě. Barveno DAPI (jádra) □ modrá, transferin-A594 □ červená. **B)** K liniím Colo-206F a DLD-1 byl přidán 36 μ M dynasore 30 minut před aplikací TRAILu. TRAIL (200ng/ml) byl s buňkami inkubován 30, 60 a 90 min. Buňky s inhibovanou endocytózou vykazovaly menší podíl M30-FITC pozitivních buněk a tím i nižší aktivitu kaspázy-3. Nejvýraznější rozdíly oproti kontrole byly zaznamenány ve 30. a 60. minutě.

5.4 Změny v aktivaci kaspázy-3 vyvolané potlačením acidifikace endozomálních kompartmentů

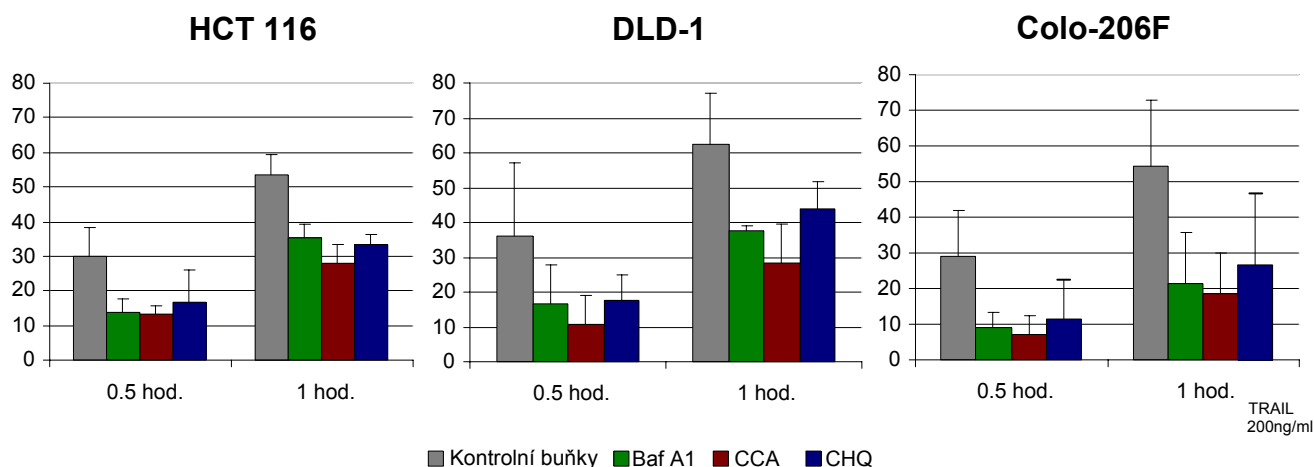
Po zjištění, že inhibice oddělování váčků od membrány vede ke snížení apoptózy, jsme analyzovali, zda také s endocytózou spjatá acidifikace endozomů může mít vliv na TRAILem aktivovanou apoptózu. K tomuto účelu jsme použili concanamycin A a bafilomycin A1, dva specifické inhibitory protonové vakuolární pumpy (H^+ -ATPázy/V-ATPázy). Obě tato antibiotika působí v savčích buňkách cíleně na V-ATPázu a snižují tak pH v endozomech a lyzozomech. Zároveň tím zabraňují přeměně časných endozomů v pozdní endozomy/MVB a následně v lyzozomy (Bowman & Bowman, 2005, Clague et al., 1994). Navíc jsme pro inhibici acidifikace použili chloroquine, který má jiný způsob účinku než řadě dalších antibiotika. Jedná se lyzomotropickou látku, která se díky svým vlastnostem selektivně akumuluje v lyzozomech a endozomech, kde díky kyselému prostředí mění svůj náboj na kladný a zvyšuje tak pH organel s kyselým prostředím, což má za následek omezení funkčnosti enzymů a změnu posttranslačních modifikací (Savarino et al., 2003). Concanamycin A a bafilomycin A1 byly přidávány k buňkám 30 minut před TRAILem ve 20 nM koncentraci. Chloroquine byl k buňkám přidán 1 hodinu před aplikací TRAILu v koncentraci 50 μ M. Poté byl aplikován TRAIL a ponechán spolu s inhibitory na buňkách dalších 30 nebo 60 minut. Apoptotické buňky byly detekovány pomocí protilátky M30-FITC a kvantifikovány průtokovou cytometrií.

Po použití těchto inhibitorů jsme pozorovali výrazné snížení aktivace kaspázy-3 u všech třech buněčných liniích (**Obr 5.4 A**). V prvních 30 minutách s TRAILem se apoptóza snížila na 30-50% oproti kontrolním buňkám. Během dalších 30 minut se u linií DLD-1 a HCT 116 apoptóza dostala v průměru na 70% vůči kontrole. U Colo-206F se pokles apoptotických buněk držel na 40-50%.

Dále byl testován dlouhodobý účinek těchto antibiotik. Apoptózu jsme sledovali po dobu 4 hodin od přidání TRAILu na Colo-206F buňkách, které se jeví jako nejcitlivější k inhibičním účinkům blokátorů acidifikace endozomů. Ukázalo se, že během dalších 3 hodin jejich účinnost stále klesá, a že se počet apoptotických buněk dostane téměř na úroveň kontrolních (**Obr 5.4 B**). Snížení acidity endozomálních kompartmentů tedy vede k časově omezené inhibici TRAILem indukované apoptotické signalizace. Pro větší specifitu a vyšší účinnost byly v dalších pokusech používány spíše inhibitory V-ATPázy.

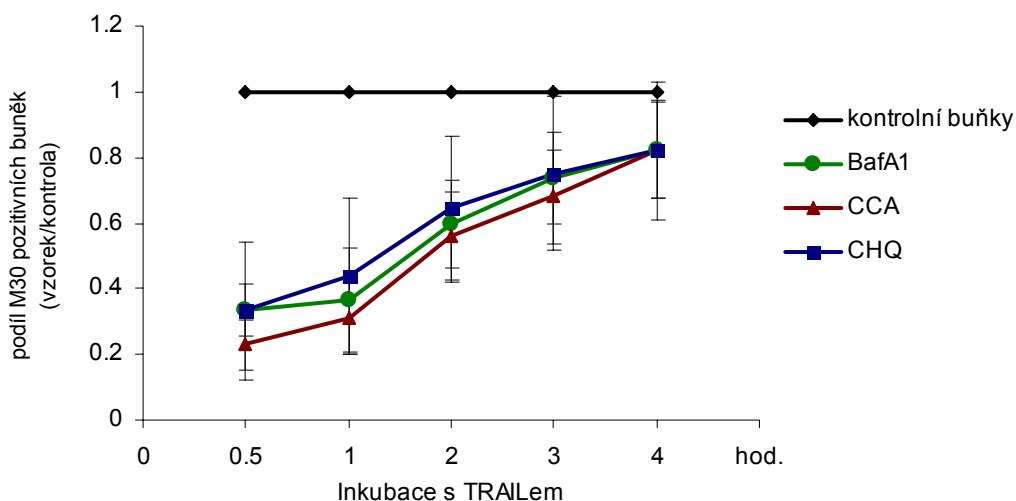
A)

Počet M30-FITC pozitivních buněk v % z celkového počtu buněk



B)

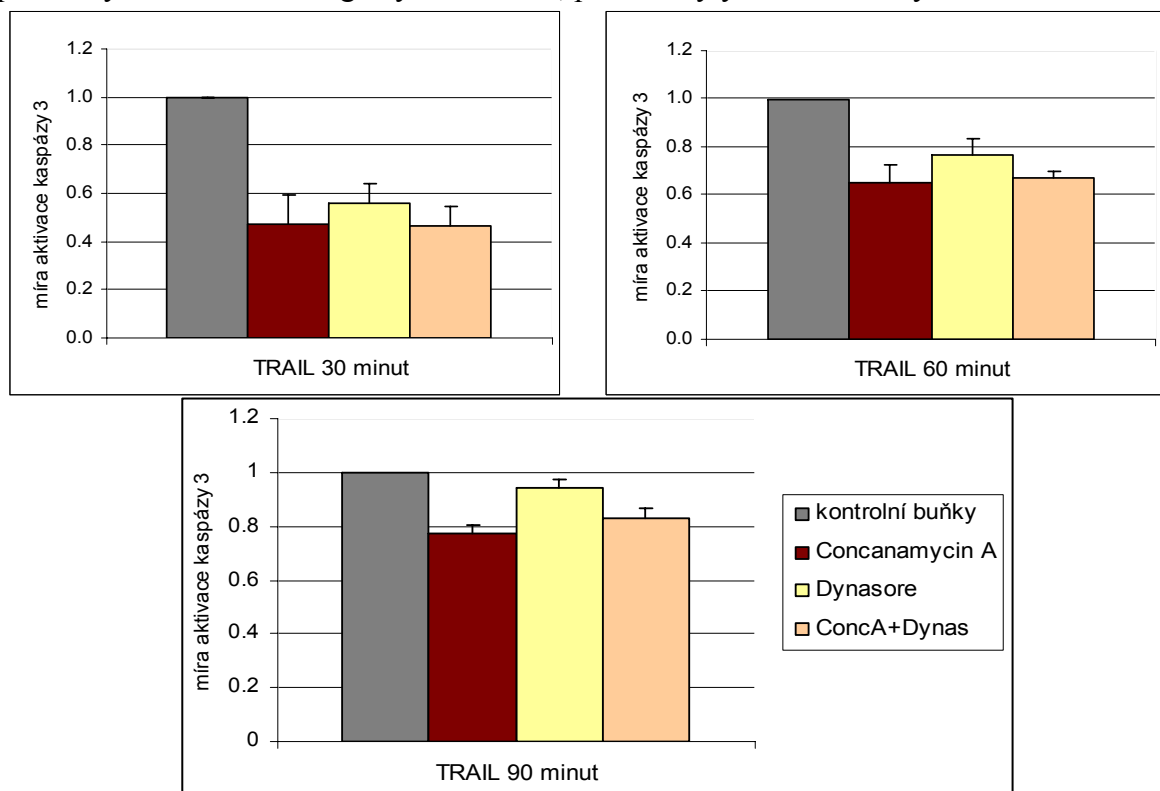
Hladina aktivní kaspázy-3 vztaženo ke kontrole



Obrázek 5.4 Vliv inhibice acidifikace endozomů a lyzozomů na TRAILem indukovanou apoptózu. **A)** Buněčné linie HCT 116, DLD-1, Colo-206F byly inkubovány s inhibitory V-ATPázy concanamycinem A (20nM), bafilomycinem A1 (20nM) a s lyzotropickým činidlem chloroquinem (50 μ M). Inhibitory V-ATPázy byly k buňkám přidány 30 minut před TRAILem, chloroquine 60 minut předem. Po té byl k buňkám na 30 a 60 minut přidán TRAIL (200ng/ml) a buňky byly i nadále s inhibitory inkubovány ve 37 °C. Ve všech případech došlo ke snížení aktivity kaspázy-3 a tím i apoptotických buněk (barvení protilátkou M30-FITC). Větší rozdíly byly zaznamenány po 30 minutách od indukce apoptózy. **B)** Dlouhodobá inkubace buněk Colo-206F s inhibovanou acidifikací a s TRAILem (0,5-4 hod.) ukázala, že ke snižování apoptózy již dále nedochází a naopak se poměr M30 pozitivních buněk vrací na úroveň kontroly. Grafy znázorňují průměrné hodnoty ze tří opakování a SD (směrodatnou odchylku).

5.5 Vliv souběžné inhibice acidifikace a endocytózy na indukci apoptózy

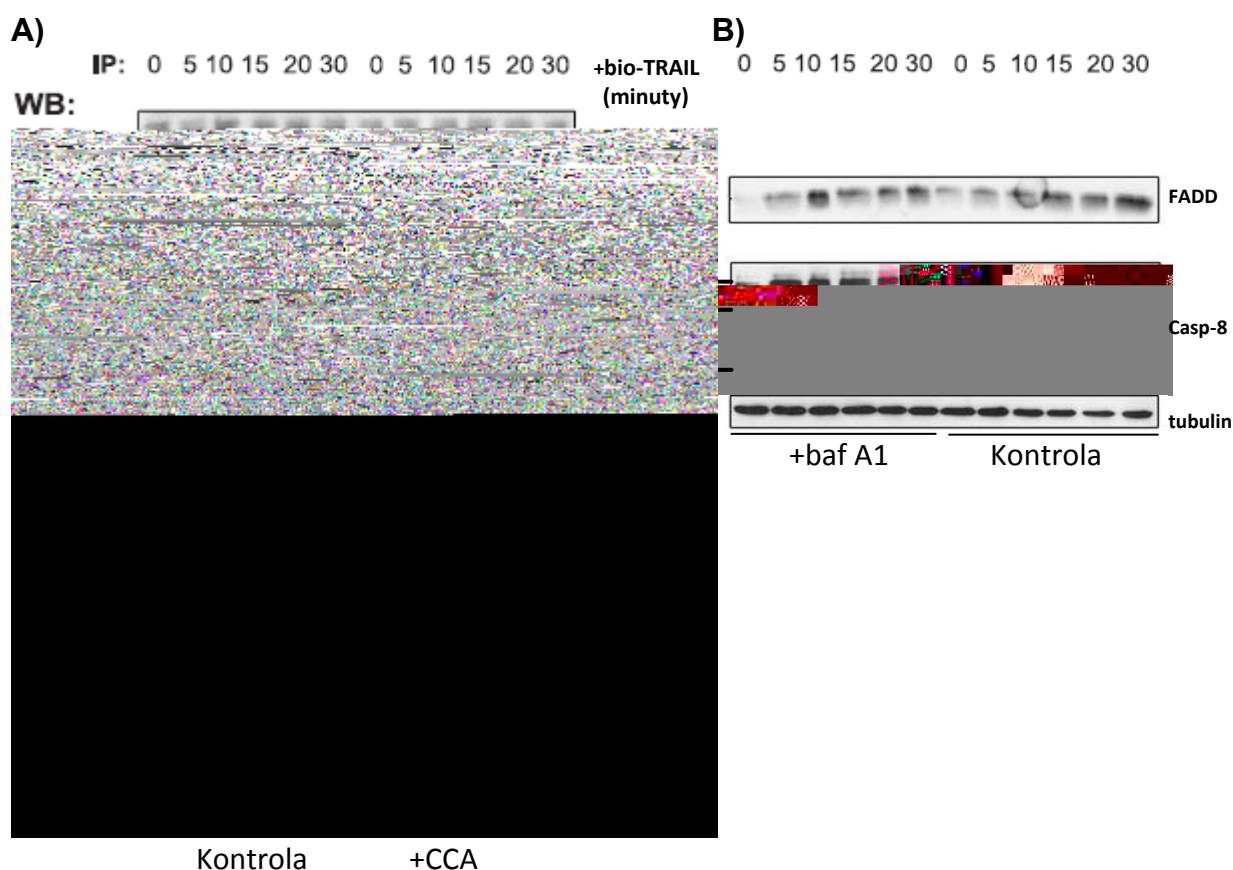
Na buněčných liniích Colo-206F a DLD-1 jsme sledovali, zda při souběžném použití obou typů inhibitorů bude docházet i k dalšímu snížení apoptotických buněk. Pro blokaci endocytózy byl použit opět 36 μ M dynasore a zároveň byla pomocí concanamycinu A (20 nM) zablokována V-ATPáza. Dynasore i CCA byly k buňkám přidány 30 minut před počátkem inkubace s TRAILem a ponechány na buňkách po celou dobu trvání pokusu (90 minut). TRAIL byl přidáván po 30, 60 a 90 minutách. Následně byly buňky zpracovány dle standardního protokolu a změřena aktivace kaspázy-3. Očekávali jsme, že by inhibitory mohly mít aditivní efekt, ale jak vyplývá z grafů (**Obr. 5.5**), samotný concanamycin A má největší vliv na snížení apoptózy. Účinek dynasoru je přibližně o 10% horší. Počet apoptotických buněk při použití obou inhibitorů není nižší než při aplikaci samotného CCA. DLD-1 buňky vykazovaly stejnou tendenci jako Colo-206F. U linie HCT 116 docházelo po použití dynasoru k morfologickým změnám, proto nebyly dále testovány.



Obrázek 5.5 Inhibice endocytózy a acidifikace. Buňky Colo-206F byly 30 min. preinkubovány s CCA, dynasorem a jejich kombinací a byl analyzován vliv těchto inhibitorů na TRAILem indukovanou aktivaci kaspázy-3, po 30, 60 a 90 minutách od aplikace TRAILu. Při souběžné inhibici endocytózy (dynasore) a acidifikace (CCA) nedošlo již k dalšímu snížení počtu M30 pozitivních buněk. Nejmenší počet apoptotických buněk jsme zaznamenali při použití samotného concanamycinu A a to ve 30. minutě. Grafy ukazují průměrné hodnoty ze čtyř opakování a SD.

5.6 Vliv inhibice acidifikace endozomů na vznik a aktivaci TRAIL-DISC komplexu

Abychom mohli analyzovat další případné změny v důležitých článcích apoptotické dráhy, provedli jsme precipitaci DISCu pomocí biotinylovaného TRAILu. Linie Colo-206F (**Obr. 5.6 A**) a HCT 116 (**Obr. 5.6 B**) jsme inkubovali opět 30 minut s inhibítorem V-ATPázy a následně jsme v intervalech po 5. minutách přidávali biotinylovaný TRAIL. Obrázek 5.6 A porovnává zásadní komponenty DISCu u neinhibovaných Colo-206F buněk a stejných buněk s concanamycinem A. Největší změny jsou pozorovatelné u výrazně nižší aktivace kaspázy-8 (tj. řezání do p20/18 forem) a to jak u Colo-206F, tak i HCT 116 buněk s potlačenou acidifikací endozomů. U buněk Colo-206F jsme také pozorovali nižší asociaci adaptorového proteinu TRAF2 s DISCem. U dalších důležitých proteinů např. DR5, FADD, cFLIP nebyla prokázána žádná významná změna.



Obrázek 5.6 Vliv inhibice acidifikace na formování a aktivaci TRAIL-DISC komplexů. Byla provedena analýza kinetiky a aktivace základních komponent DISCu pomocí precipitace TRAIL-DISC komplexů, na Colo-206F buňkách (**A**) a částečně i na linii HCT 116 (**B**). Biotinylovaný TRAIL byl přidáván v koncentraci 1 μ g/ml po dobu 5-30 minut. Na polovinu vzorků byl aplikován inhibitor V-ATPázy (CCA/Baf A1) 30 minut před přidáním bio-TRAILu. Uvedené proteiny byly analyzovány jak v DISC precipitátech, tak některé u Colo-206F buněk i na celkových lyzátech.

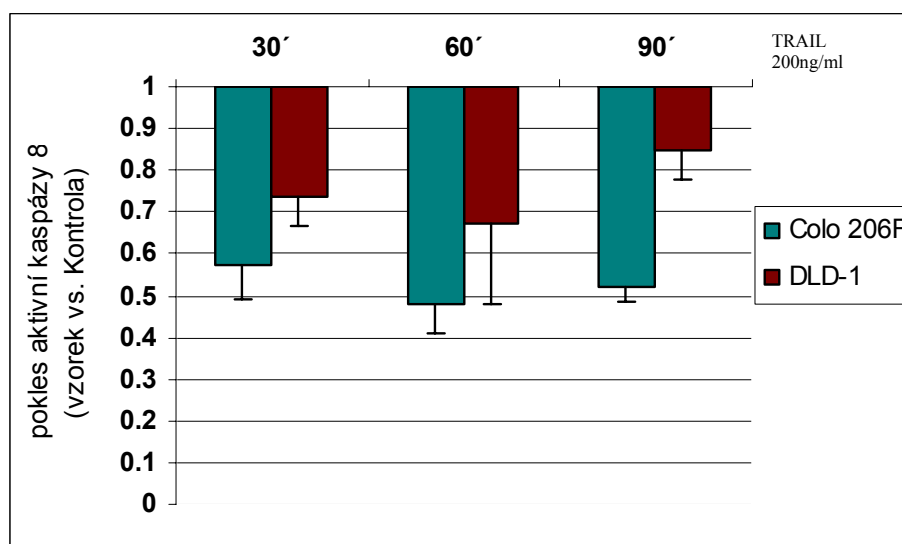
5.7 Sledování změn v aktivaci kaspázy-8 po inhibici acidifikace

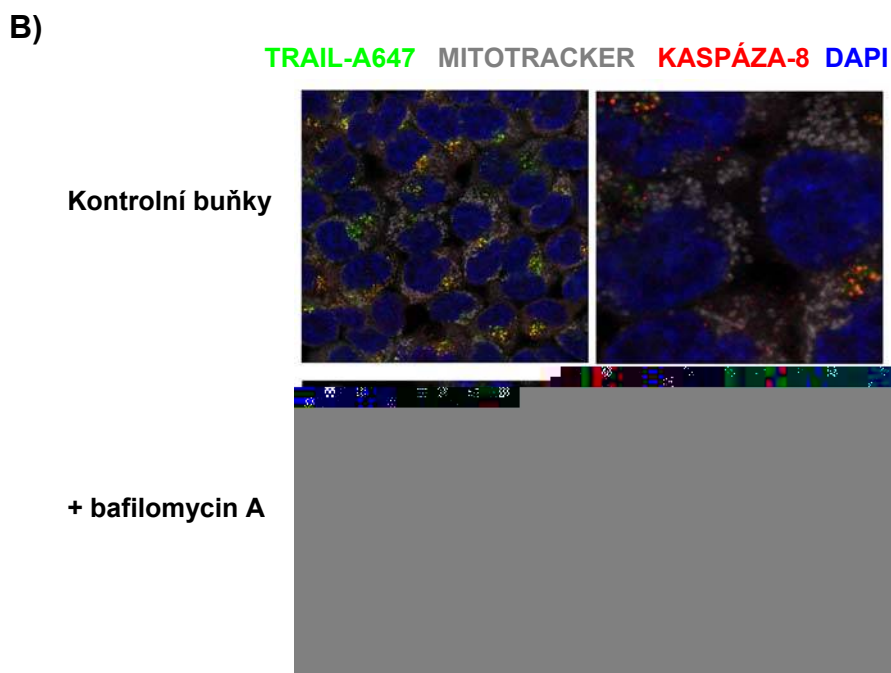
Na precipitovaných komplexech TRAIL-DR-DISC je patrné snížení aktivace kaspázy-8. Navíc při snížení acidity endocytických váček opakovaně docházelo k poklesu aktivity efektorové kaspázy-3, proto jsme se chtěli přesvědčit, zda je tomu stejně i v případě iniciační kaspázy-8. Buňky DLD-1 a Colo-206F jsme analyzovali nejdříve pomocí průtokové cytometrie. Buňky byly standardně inkubovány s TRAIEm a s bafilomycinem A1. Pro detekci byla použita protilátka proti γ špené a tedy aktivní formě kaspázy-8. Z výsledků vyplývá, že v důsledku blokace V-ATPázy dochází i k úbytku aktivní formy kaspázy-8 (**Obr. 5.7 A**). U Colo-206F došlo k poklesu aktivní formy kaspázy o více než 50% v 60. minutě od indukce apoptózy. U DLD-1 buněk byl úbytek o něco menší (68% v 60. minutě), ale tendence byla stejná jako u Colo-206F.

Dále jsme aktivitu kaspázy-8 analyzovali pomocí konfokální mikroskopie, za použití stejné protilátky. Pokles aktivní formy kaspázy-8 byl pozorovatelný i v tomto případě. Linií HCT 116 jsme ponechali 1 hodinu s TRAIEm-Alexa 647 (200ng/ml) a dohromady 1,5 hodiny s bafilomycinem A1. Buňky inkubované s inhibitorem nejen že obsahovaly mnohem méně aktivní formy kaspázy-8, ale navíc TRAIL a kaspáza-8 nebyly lokalizovány v jasně viditelných shlucích-receptozomech (**Obr. 5.7 B**). Inhibice V-ATPázy tedy mění i pohyb a rozmístění celého komplexu TRAIL-DISC v buňce.

A)

Pokles aktivní formy kaspázy-8 po aplikaci baf A1



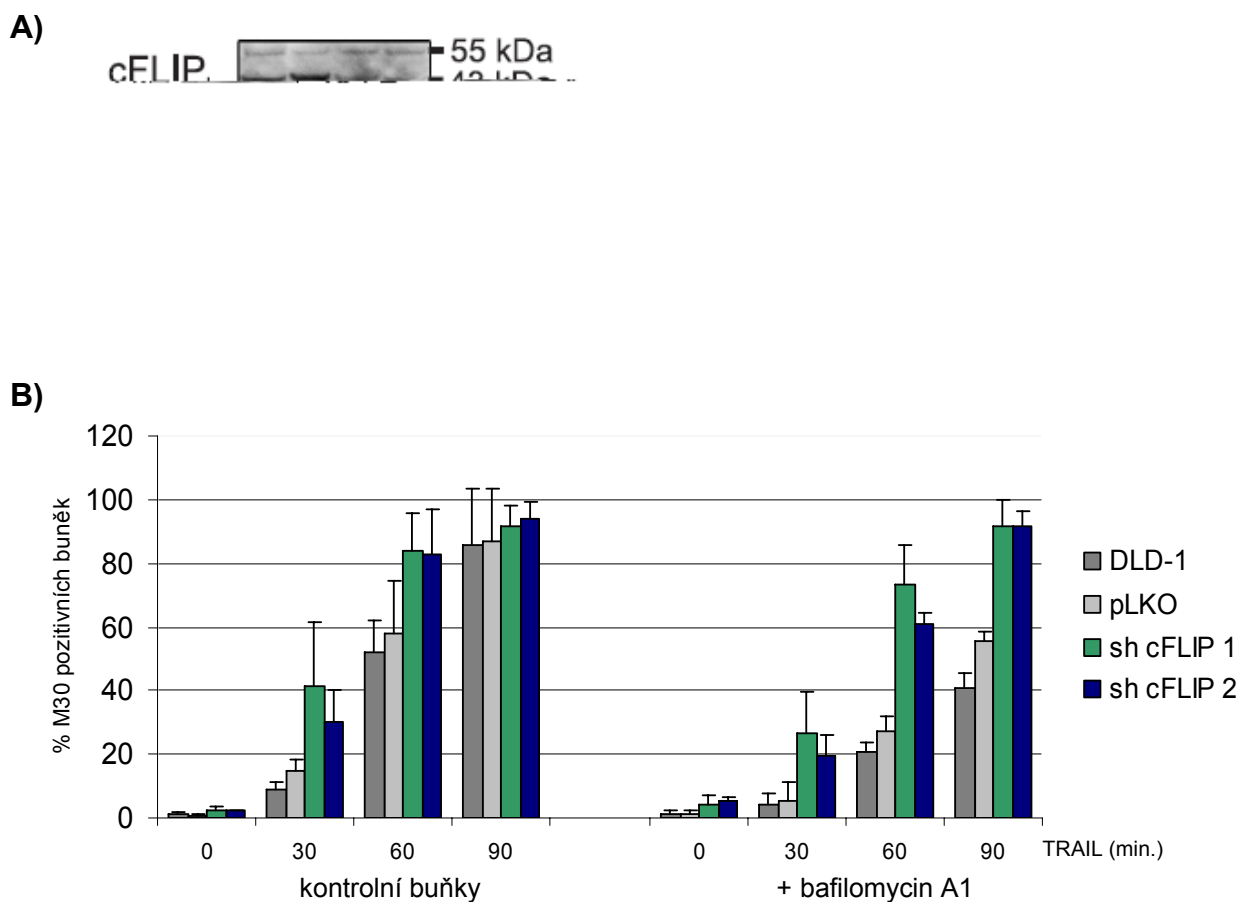


Obrázek 5.7 Vliv inhibice vATPázy na TRAILem indukovanou aktivaci kaspázy 8. A) Linie Colo-206F a DLD-1 byly po preinkubaci s bafA1 (30 min., 20nM) inkubovány s TRAILem opět 30, 60 a 90 minut. Poté byly, pro sledování aktivace kaspázy-8, barveny protilátkou proti aktivní kaspáze-8 a analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Vynesen je relativní pokles v aktivaci kaspázy-8 vůči buňkách, které byly inkubovány pouze s TRAILem, nikoliv s bafA1. Graf znázorňuje průměr ze tří opakování a standardní odchylky. B) Buňky byly inkubovány 60 minut s TRAILem-Alexa 647. Zviditelněny byly mitochondrie a aktivovaná kaspáza-8. Pokles aktivní formy kaspázy-8, po inhibici acidifikace, je patrný i z mikroskopických snímků linie HCT 116. Kaspáza-8 spolu s TRAILem netvoří shluky a je oproti kontrole méně výrazná. TRAIL-A647 - zelená, MitoTracker - žlutá, kaspáza-8 - červená, DAPI (jádra) - modrá.

5.8 Snížení exprese proteinu cFLIP pomocí shRNA a vliv této změny na indukci apoptózy u buněk s blokadí V-ATPázy

Zásadní inhibiční efekt na aktivaci kaspázy-8 má cFLIP, který je také součástí DISCu a tudíž endocytovaného receptozomu. Zajímalo nás, zda při snížené hladině cFLIPu bude i nadále patrný inhibiční efekt bafilomycinu A1 nebo zda bude tento jev potlačen. Použili jsme dvě různé shRNA pro cFLIP a kontrolní, neumlčující shRNA (značena pLKO). Nejdříve jsme ověřili, zda je hladina proteinu cFLIP skutečně snížena (**Obr. 5.8 A**). Poté byla analyzována hladina apoptózy. K transdukovaným buňkám DLD-1 linie držným pod stálou selekcí jsme přidali bafilomycin a TRAIL dle standardního protokolu. Buňky jsme barvili protilátkou M30-FITC a následně analyzovali pomocí průtokové cytometrie.

Dle očekávání snížená exprese cFLIPu způsobila zásadní navýšení apoptózy, jak u buněk, kde nebyla blokována acidifikace, tak i u buněk s inhibovanou ATPázou. Ovšem vzorky, na které byl aplikován bafilomycin A1, vykazovaly nižší hladinu apoptotických buněk než buňky kontrolní a to i linie s potlačenou expresí cFLIPu (**Obr. 5.8 B**). To znamená, že inhibice acidifikace nedokázala zcela vykompenzovat sníženou hladinu cFLIPu, ale i přes to, oproti kontrolním buňkám, zůstal lehký inhibiční efekt bafilomycinu A1 do 60. minuty zachován. Protein cFLIP tedy není tím činitelem, který blokuje apoptózu při snížení acidity kompartmentů nebo to alespoň není jediný faktor inhibice.

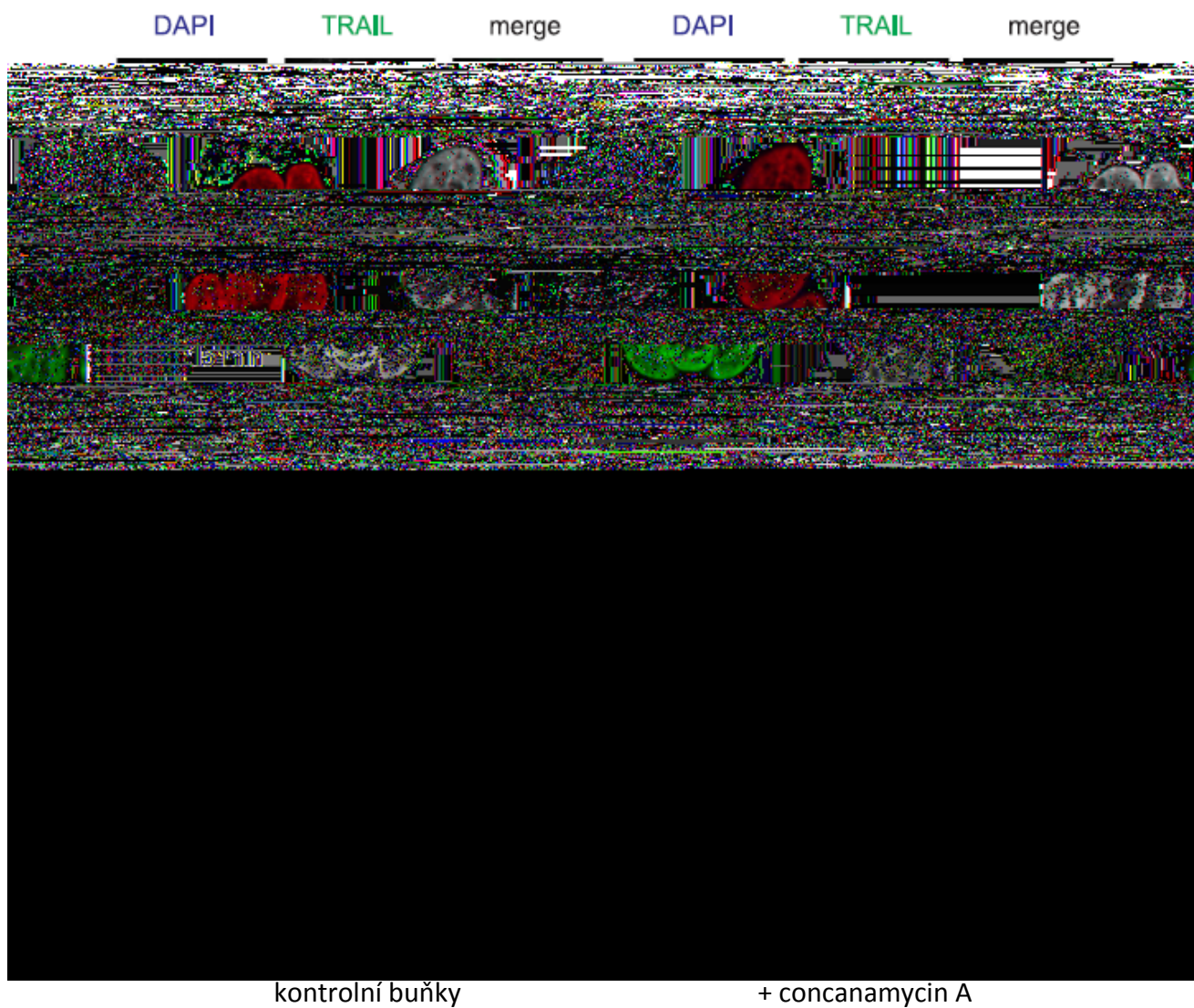


Obrázek 5.8 Snížení exprese proteinu cFLIP. A) Buňky, které obsahovaly lentivirální vektor se sekvencí pro shRNA byly analyzovány standardním postupem pomocí western blottingu. Došlo ke snížení exprese cFLIPu u obou vláseňek, hladina u kontrolní vláseňky p.LKO zůstala zachována. **B)** U linie DLD-1 byly selektovány buňky se sníženou expresí cFLIPu (sh cFLIP 1, sh cFLIP 2) a buňky nesoucí kontrolní plazmid p.LKO. K polovině vzorků byl přidán inhibitor bafilomycin A1 a ke všem TRAIL, po dobu 30, 60, 90 minut. Kultury se sníženou expresí cFLIPu vykazovaly zřetelný nárůst apoptotických buněk oproti liniím s normální expresí (DLD-1, pLKO). U vzorků, ke kterým jsme přidali baf A1, byl nárůst apoptózy menší než u linií bez inhibované V-ATPázy. Data byla získána ze tří nezávislých experimentů. Grafy znázorňují průměrné hodnoty a SD.

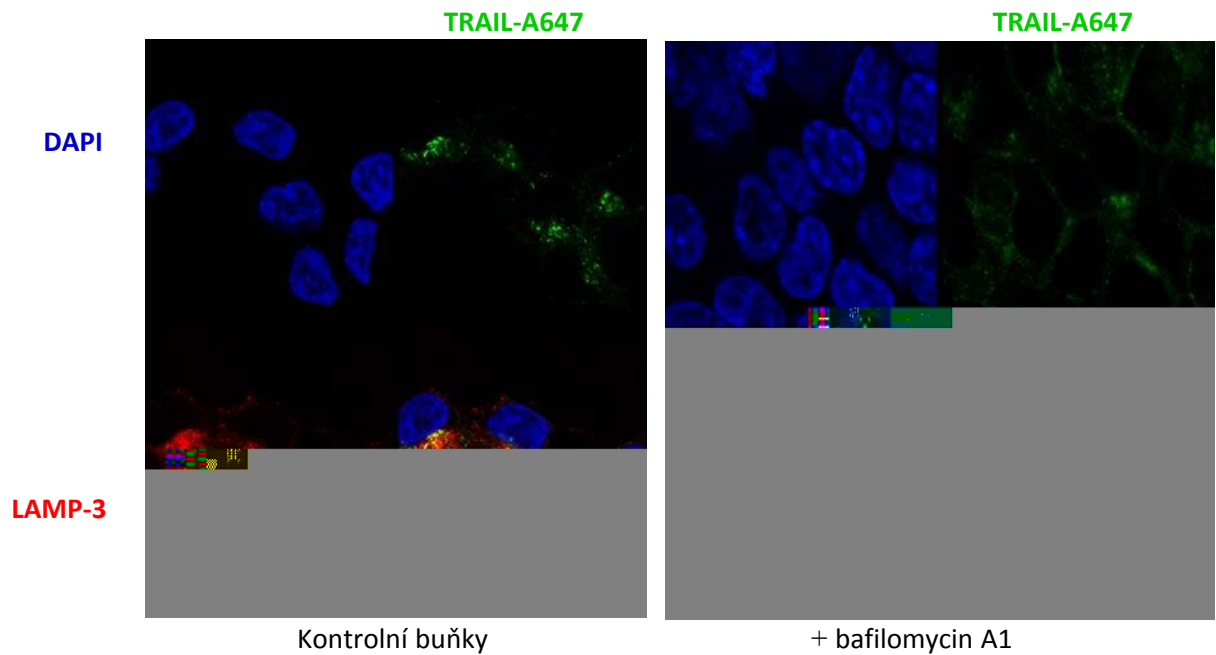
5.9 Změny lokalizace a seskupování TRAIL receptozomů po inhibici V-ATPázy

Výrazný negativní vliv inhibice vakuolární acidifikace na aktivaci a kinetiku TRAILem indukované apoptózy modelových kolorektálních linií mohl souviset i se změnou kinetiky či morfogeneze endocytického procesu. Tudiž jsme pomocí konfokální mikroskopie za využití fluorescenčního TRAILu-A647 analyzovali kinetiku vzniku a zrání TRAIL receptozomů. K HCT 116 buňkám, buď neinkubovaným či preinkubovaným s CCA, jsme přidali TRAIL a analyzovali jsme formování a lokalizaci TRAIL receptozomů. Buňky jsme obarvili pouze DAPI pro vizualizaci jader. Ze snímků je patrné, že inhibice acidifikace mění rozložení TRAILu v buňce. TRAIL není ve 30. min po aplikaci lokalizován ve větších shlucích jako u kontrolních buněk, ale je mnohem více rozptýlen. U kontrolních buněk jsou jasně patrné shluky internalizovaného TRAILu, ale u buněk s inhibitorem žádné takové výrazné útvary nevidíme (**Obr. 5.9 A**). Navíc můžeme v 90. minutě u kontrolních buněk pozorovat změnu morfologie jader, což znamená, že se buňka nachází již v pokročilém stádiu apoptózy. U buněk s concanamycinem A žádné takové změny na jádru nevidíme, tudíž je celý průběh apoptózy zpomalen.

U dalších vzorků, které byly navíc barvené protilátkou proti lyzozomálnímu markeru LAMP-3, jsme pozorovali změnu v kolokalizaci s lyzozomem. Zatímco v 60. minutě od aplikace TRAILu buňky HCT 116 viditelně kolokalizují s lyzozomem a tvoří výrazné shluky, po zablokování V-ATPázy je TRAIL-A647 více difúzní a nenachází se v lyzozomálních váčcích (**Obr. 5.9 B**).



Obrázek 5.9.1 Lokalizace endocytovaného TRAILu po inhibici V-ATPázy. Buňky byly inkubovány s TRAILem-Alexa 647 (200ng/ml) po dobu 15-90 minut. K polovině vzorků byl 30 min. před inkubací přidán inhibitor baf A1. TRAIL-647 je již od prvních minut indukce apoptózy u buněk s inhibovanou V-ATPázou méně viditelný. Je více rozptýlen po buňce a netvoří jasné shluky. V 60. a 90. minutě je TRAIL již viditelný, avšak je světlejší a difúznější než u vzorků kontrolních. Jádra buněk s inhibitorem navíc nevykazují v 90. minutě apoptotické znaky na rozdíl od kontrolních vzorků. Jádra byla barvena DAPI modrá, TRAIL-647 zelená.



Obrázek 5.9.2 Změna kolokalizace TRAILu s lyzozomy. Linie HCT 116 byla inkubována 30 min. s baf A1 a poté 60 minut s TRAILem-Alexa 647. Pro vizualizaci lyzozomů byl použit marker LAMP-3. Bafilomycin A1 zřetelně mění kolokalizaci TRAILu s lyzozomem (marker LAMP-3). U buněk, ke kterým byl přidán bafilomycin A1, je TRAIL hůře viditelný, netvoří jasné shluky a nekolokalizuje s lyzozomálním markerem. Jádra nejsou tolik poškozena apoptózou jako u kontroly. Buňky byly barvené: DAPI (jádra) - modrá, LAMP-3 - červená, TRAIL-Alexa647 □zelená.

6. DISKUZE

Rekombinantním ligandem TRAIL indukovaná apoptóza nádorových buněk může pro svoji specifitu, účinnost a flexibilitu perspektivně hrát významnou roli v protinádorové terapii. Třebaže základní principy TRAILem indukované apoptózy již byly objasněny, tak mnohé z regulačních mechanismů zůstávají pouze v rovině spekulací. Mezi tyto regulační mechanismy pravděpodobně patří i děje spojené s endocytózou receptozomů obsahující aktivovaný TRAIL-receptorový komplex. Je známo, že TRAIL a jeho receptory podléhají internalizaci stejně tak, jako je tomu u receptoru TNF-R1 a FasR (Tchikov et al., 2011). Zatímco u TNF-R1 je internalizace potřebná k indukci apoptózy, u FasR vliv internalizace na apoptotickou signalizaci závisí na tom, zda je buňka apoptotický typ I nebo II (Lee et al., 2006a, Schneider-Brachert et al., 2004, Schutze et al., 1999, Schneider-Brachert et al., 2006). Úloha endocytózy TRAILového receptozomu a její vliv na apoptotickou signalizaci jsou ještě méně objasněné, než je tomu u výše zmíněných receptorů. Pravděpodobně se však vliv internalizace odvíjí od konkrétního buněčného typu, ale nebyla prokázána souvislost s apoptotickou signalizací typu I a II (Kohlhaas et al., 2007, Akazawa et al., 2009, Austin et al., 2006). Další práce navíc poukazují na souvislost mezi poruchami internalizace či recyklace váčků a rezistencí prsních a kolorektálních nádorových buněk k TRAILem indukované apoptóze (Zhang & Zhang, 2008, Jin et al., 2004). Protože dosud publikované výsledky zmiňují jak pozitivní, tak negativní vliv internalizace u různých typů nádorových buněk, rozhodli jsme se úlohu endocytózy TRAIL receptozomu sledovat na liniích odvozených od kolorektálního karcinomu.

Na počátku tohoto projektu jsme zjistili, že u buněčných linií kolorektálního karcinomu dochází po navázání TRAILu k internalizaci DR4 i DR5 receptorů. Pilotní pokusy provedené Mgr. Horovou naznačovaly, že by internalizace u našich linií mohla mít pozitivní vliv na apoptózu indukovanou TRAILem. Po použití chlorpromazinu (inhibitoru klatrinové internalizace) docházelo ke zřetelnému poklesu hladiny apoptotických buněk (data neuvedena). Překvapivě byly tyto výsledky v rozporu s publikovanými daty, kde byl chlorpromazin aplikován na buňky prsního karcinomu, u kterých došlo ke značnému nárůstu apoptózy (Zhang et al., 2009, Zhang & Zhang, 2008). To však může být zapříčiněno mnohem delšími inkubačními časy u linií prsního karcinomu nebo odlišnými typy buněk.

Dále jsme zjišťovali, zda je TRAIL receptozom u našich modelových linií také internalizován pomocí na klatrinu závislé dráhy. Jedna z publikovaných prací totiž naznačuje, že TRAIL nemusí být internalizován pouze klatrinovými váčky (Kohlhaas et al.,

2007). Pomocí markerů základních endocytických drah (klatrin, caveolin-1), jsme určili, že TRAIL je endocytován na klatrinu závislou dráhou. Tento výsledek byl potvrzen i metodou RNA interference. K zablokování endocytózy TRAIL receptozomu došlo pouze při použití siRNA proti těm u řetězci klatrinu a částečně proti AP μ 2. Jiné siRNA (cdc42, caveolin-1, siKO) vliv na endocytózu TRAILu neměly.

Ačkoli bylo publikováno, že TRAIL se po internalizaci nachází mimo jiné i v Golgiho aparátu (Zhang et al., 2000), naše výsledky ukazují jasnou přítomnost TRAIL receptozomu v endozomech a následně lyzozomech a nikoliv v Golgiho komplexu. Stálý výskyt aktivované kaspázy-8 v blízkosti endocytovaného receptozomu naznačuje, že celý DISC je internalizován spolu s TRAIlem. Díky tomu může být asociace DISCu a následná signalizace ovlivněna endozomálním prostředím, jako je tomu v případě internalizace Fas receptozomu u buněčného typu I (Lee et al., 2006a). A/nebo by internalizovaný komplex TRAIL-DISC mohl mít vliv na vlastnosti endozomů a lyzozomů, např. na permeabilizaci, která byla pozorována po internalizaci TRAIL receptozomu u HCC buněk a v také po endocytóze TNF-R1 (Akazawa et al., 2009, Heinrich et al., 2004).

Pro další možné sledování a ovlivnění endocytózy jsme připravili fluorescenčně značené receptory DR4-EYFP a DR5-EYFP a mutovali jejich tyrosinové internalizační motivy. Ze získaných dat vyplynulo, že pokud je zároveň mutován tyrosin i hydrofobní aminokyselina (u DR4/5-leucin), tak je internalizace narušena. Bohužel se zatím kvůli problematické transfekci nepodařilo tento experiment provést v dostatečném opakování a na větším počtu buněk. Tyto výsledky tedy nemůžeme s jistotou potvrdit a tudíž nejsou prezentovány ani ve výsledkové části této diplomové práce.

Vliv blokace internalizace TRAIL receptozomu na indukci apoptózy jsme si ověřili zablokováním endocytózy dynasorem, inhibitorem dynaminu. Blokace endocytózy aktivovaných TRAIL receptozomů způsobila dočasný, ale reprodučibilní pokles aktivace kaspáz. Inhibiční vliv dynasoru byl markantní zejména v rané fázi apoptózy ve 30. minutě, kdy u TRAIlem indukovaných buněk Colo-206F došlo k poklesu aktivity kaspázy-3 téměř o 50%. V dalších časových bodech (60 a 90 minut) se rozdíl mezi inhibovanými a kontrolními buňkami vyrovnával. Zdá se tedy, že internalizace receptozomu nějakým způsobem přispívá k indukci apoptózy u buněk kolorektálního karcinomu, ale pokud je endocytóza inhibována buňka je schopná tuto nevýhodu obejít a nedojde tak k úplné inhibici apoptotické signalizace.

Tento pouze dočasný efekt inhibitorů na apoptotickou signalizaci by mohl vysvětlovat rozdílné výsledky publikované ve studiích Kohlhaas a spol., 2007 a Austin

a spol. 2006. V těchto publikacích byla endocytóza blokována pomocí zvýšené hypertonické koncentrace extracelulární sacharózy či nadprodukcí dominantně negativního mutantu dynaminu K44A. Inhibice endocytózy TRAIL receptozomů neměla ani u jednoho případu žádný negativní vliv na apoptotickou signalizaci. Měření hladiny apoptotických buněk však probíhala až po 2- 4 hodinách od indukce apoptózy, kdy ani my jsme nepozorovali žádný zásadní rozdíl mezi kontrolními a inhibovanými buňkami. Navíc inhibice pomocí KAA4 dynaminu je dlouhodoběji indukuje se 48 hodin před aplikací TRAILu a tím by mohlo dojít k nahromadění receptorů na membráně a tedy i zesílené signalizaci. Obdobně buněčný stres vyvolaný hypertonickým vnějším prostředím může spustit některou ze signalizačních drah vedoucí k apoptóze (Kohlhaas et al., 2007, Austin et al., 2006).

Postupný pokles pH je typickou vlastností endozomálních kompartmentů, což nás dovedlo, ve spojitosti se zpomalením TRAILem indukované apoptotické signalizace po inhibici endocytózy, k podrobnější analýze vlivu endozomální acidifikace. Zvýšená acidifikace endozomů je také spojována s indukcí apoptózy skrze FasL. Internalizovaný Fas receptozom dokonce snižuje pH v endozomech a tím zvyšuje produkci ceramidů a ROS, čímž dojde k akceleraci apoptotických dějů. Inhibice acidifikace pomocí bafilomycinu všechny tyto děje utlumila (Reinehr et al., 2008). Kyselé prostředí endozomálních kompartmentů je také potřebné pro účinnější signalizaci skrze Notch a TLR3 a inzulinové receptory i během Wnt signalizace. Při zablokování acidifikace endozomálních kompartmentů pomocí inhibitorů V-ATPázy (CCA, baf A1) vždy došlo k utlumení těchto signalizačních drah (Balbis et al., 2004, Vaccari et al., 2010, Niehrs & Boutros, 2010, Vu et al., 2011). Obecně je během apoptotických procesů pozorováno snížení intracelulárního pH a zdá se, nižší pH se podílí na řízení apoptotické signalizace (Lagadic-Gossmann et al., 2004).

U našich modelových linií jsme použili jak výše zmíněné inhibitory V-ATPázy, tak i lyzotropické činidlo (CHQ). Ve všech případech došlo po inhibici acidifikace k poklesu aktivace kaspázy-3, tím tedy i k utlumení apoptotické signalizace. Tento pokles měl opět pouze dočasný charakter a dlouhodobá inkubace ukázala, že během 4 hodin od přidání inhibitorů hladina apoptotických buněk roste a přibližuje se stále více kontrole. Stejně jako inhibice endocytózy, tak i snížení kyselosti endozomálních kompartmentů vede ke zpomalení apoptotické signalizace, ale nikoliv k úplnému zastavení apoptózy.

Souběžná inhibice endocytózy a acidifikace neměla aditivní efekt. Nedošlo k dalšímu snížení apoptózy ani k prodloužení doby, po kterou je apoptotická signalizace utlumena.

Stejně jako u kaspázy-3, došlo po inhibici V-ATPázy ke snížení aktivace kaspázy-8. Kaspáza-8 je iniciační kaspáza a tudíž snížení její aktivity má za následek i snížení aktivace

celé TRAILem indukované apoptotické signalizace (Gonzalvez & Ashkenazi, 2010). Toto výrazné snížení aktivace po inhibici vakuolární ATPázy jsme potvrdili hned několika nezávislými pokusy – analýzou aktivace kaspázy-8 v precipitovaném receptorovém komplexu DISC či kvantifikací/detekcí aktivované kaspázy-8 pomocí průtokové cytometrie nebo konfokální mikroskopie. Z našich zjištění tedy jednoznačně vyplývá, že acidifikace endozomů má pozitivní vliv na míru aktivace kaspázy-8 v DISCu. Tento efekt ale zřejmě nesouvisí s nízkou hladinou kaspázy-8 v DISCu, neboť její relativní množství v DISCu je obdobné jak u buněk kontrolních, tak i u buněk preinkubovaných s CCA/baf A1 (viz Obr. 5.6).

Protein cFLIP, který je hlavním inhibítozem kaspázy-8, dokázal v nadprodukcii účinně snížit lyzozomální permeabilizaci a tím tedy i TRAILem indukovanou apoptotickou signalizaci u Huh-7 buněk (Guicciardi et al., 2007). Abychom zjistili, zda je cFLIP zodpovědný za blokaci kaspázy-8 a pokles apoptózy po inhibici endozomální acidifikace u našich linií, snížili jsme jeho expresi pomocí RNA interference. I v buňkách, které měly sníženou hladinu cFLIPu byl však patrný rozdíl mezi kontrolou a buňkami s inhibovanou V-ATPázou. Inhibitory stále dokázaly mírně snížit hladinu apoptózy, což dokazuje, že cFLIP není plně zodpovědný za sníženou aktivitu kaspáz při poklesu acidity v endozomálních kompartmentech. Pokud by byl cFLIP tím jediným a zásadním faktorem, který po zablokování acidifikace brání aktivaci kaspáz, tak by po jeho odstranění došlo zcela k vymizení inhibičního efektu inhibitorů acidifikace.

TRAIL receptozomy navíc po inhibici acidifikace netvoří, na rozdíl od kontrolních buněk, viditelné shluky. U normálních buněk tyto shluky, čili asociující váčky, pravděpodobně vytvářející multivesikulární tělíska (MVB), pozorovatelné již od prvních minut po indukci apoptózy. U buněk s blokovanou acidifikací je TRAIL viditelný přibližně až po hodině od indukce apoptózy a i tak je mnohem více rozptýlen. Zřejmě tedy nedochází k seskupování TRAILu do endozomů a MVB. Což může být způsobeno i tím, že váčky kvůli vysokému pH nesplyvají a netvoří se tak MVB nebo pozdní endozomy (Bowman & Bowman, 2005). Jak je vidět ze snímků z konfokálního mikroskopu inhibicí acidifikace je narušeno i splnutí TRAILového receptozomu s lyzozomem. A celkově je zpožděn následný průběh apoptózy. MVB byly v recentních studiích identifikovány jako místa indukce signalizace skrze růstové faktory a během Wnt dráhy (Taelman et al., 2010, Dobrowolski & De Robertis, 2012). Je tedy možné, že prostředí MVB je důležité i pro účinnější vytváření DISCu a aktivaci kaspázy 8.

Mgr. Horová také provedla analýzu odpovědi na inhibici acidifikace u dalších buněčných linií (včetně Huh-7 a HeLa). U všech testovaných linií došlo k výraznému poklesu aktivace kaspázy-3 během první hodiny od indukce apoptózy (**Dodatkový obr. 1**). Acidifikace endozomálních kompartmentů tedy není důležitá výlučně u linií kolorektálního karcinomu, ale překvapivě i např. u HeLa linie, u které však nebyl pozorován žádný vliv endocytózy ani spojení s vnitřní lyzozomální dráhou během TRAILem indukované apoptózy (Kohlhaas et al., 2007, Akazawa et al., 2009). Je tedy zřejmé, že vliv acidifikace endozomálních kompartmentů není závislý na apoptotickém buněčném typu. Jak u buněk I. typu (DLD-1, Huh-7), tak u buněk typu II (Colo-206F, HCT 116, HeLa) docházelo ke snížení apoptotické signalizace vlivem inhibice acidifikace.

Endozomální a hlavně lyzozomální acidifikace je spojená s aktivací kyselé sfingomyelinázy (ASM). Zvýšená a na aktivní kaspáze-7 závislá činnost ASM byla pozorována během endocytózy TNF-R1 (Edelmann et al., 2011). Ceramidy produkované ASM navíc mohou hrát roli v následné apoptotické signalizaci. Umožňují shlukování TRAILu do specifických na ceramidy bohatých domén, které zprostředkují lepší přenos apoptotického signálu (Voelkel-Johnson et al., 2005, Dumitru & Gulbins, 2006). Nezaznamenali jsme však žádnou signifikantní změnu v apoptotické signalizaci po inhibici ASM a to jak pomocí inhibitoru ASM, tak po potlačení exprese ASM pomocí siRNA či shRNA (**Dodat. obr. 2A** a data neukázána). Ve spolupracující laboratoři v Brně jsme tedy nechali analyzovat případné změny v množství buněčných sfingolipidů (ceramidů a sfingosinů), vyvolané blokadou endozomální acidifikace. Bylo naměřeno pouze lehké (5-15%) snížení ceramidů C16, C18 a C24 po inhibici V-ATPázy a stejně tak po inhibici ASM. Naopak došlo k výraznému poklesu sfingosinu a sfingosin-1-fosfátu, ale to zejména v případě inhibice V-ATPázy. Jejich hladina v buňkách s inhibovanou V-ATPázou klesla na pouhou desetinu původní hodnoty (**Dodat. obr. 2B**). Sfingosiny mohou pozitivně ovlivňovat indukci apoptózy na více úrovních, včetně inhibice pro-proliferčních kináz nebo aktivací proapoptotických Bcl-2 proteinů (Woodcock, 2006, Suzuki et al., 2004, Phillips et al., 2007). Proto je tento výsledek potřeba dále prověřit a případně analyzovat, jakým způsobem snižovaná hladina sfingosinů ovlivňuje indukci apoptózy.

Dále byl v naší laboratoři analyzován vliv inhibice acidifikace na NF- κ B signalizaci a p38 kinázovou dráhu. Pomocí western blottingu byla sledována hladina základních komponent těchto drah. Nezaznamenali jsme však žádné reprodučibilní změny po inhibici V-ATPázy (**Dodat. obr. 3**). Inhibice acidifikace tedy nenarušuje ani nepodporuje seskupování cytoplasmatického komplexu 2 a aktivaci NF- κ B a p38 kinázové dráhy.

Podobně je tomu i u Fas a TNF receptozomů, kdy zablokování internalizace nevedlo ke změnám v aktivaci NF- κ B dráhy, avšak v případě Fas receptozomu byla zaznamenána zvýšená aktivita pro-proliferační Erk1/2 kinázové signalizace (Lee et al., 2006a, Tchikov et al., 2011, Schneider-Brachert et al., 2004).

Na aktivaci kaspáz a následné apoptotické signalizaci se dále podílejí posttranslační modifikace receptorů nebo kaspáz, které mohou být vlivem snížené acidifikace pozmeněny a tím se může narušit asociace DISCu a následná signalizace (Savarino et al., 2003, Gonzalez & Ashkenazi, 2010). Je také možné, že pokud se receptory a DISC nedostanou do lyzozomu nemůže dojít k následným dějům urychlujícím apoptotické děje, tak jak je tomu u buněk hepatocelulárního karcinomu (Akazawa et al., 2009). Jak bylo ukázáno, je pravděpodobné, že při inhibici acidifikace není aktivována kyselá ceramidáza, a tím se nevytvoří v endozomech vhodné prostředí pro účinnější aktivaci signalizace. Nemůžeme tedy vyloučit vliv dalších mnoha hráčů, kteří by se mohli účastnit seskupování DISCu a indukce apoptózy po internalizaci receptozomu.

Prokázali jsme však, že endocytóza a acidifikace mají vliv na indukci apoptózy během časně fáze apoptózy u vybraných linií kolorektálního karcinomu. Skutečnost, že i přes inhibici endocytózy nebo acidifikace dochází k apoptotické signalizaci a výsledný zánik buňky je pouze zpomalen, poukazuje na to, že ty to dva jevy nejsou pro apoptózu u našich modelových linií zcela zásadní, ale mohou přispět k úspěšné aktivaci apoptózy.

7. ZÁVĚR

V této diplomové práci se nám podařilo prokázat, že TRAIL a jeho receptory jsou u buněk kolorektálního karcinomu endocytovány na klatrinu závislou drahou a po endocytóze dochází ke splynutí receptozomů s endozomy a následně s lyzozomy. Dále jsme zjistili, že endocytóza urychluje časné apoptotické děje, pravděpodobně díky snadnějšímu seskupení DISCu a aktivaci iniciačních kaspáz. Na těchto procesech má významný podíl kyselé prostředí endozomů a lyzozomů. Pravděpodobně právě snižující se pH v endozomálních kompartmentech je důvodem účinnější apoptotické signalizace během první hodiny od indukce vnější apoptotické dráhy. Podařilo se nám zjistit, že během inhibice acidifikace dochází k zásadnímu poklesu sfingosinu a sfingosin-1-fosfátu v buňkách, což může být významný faktor ovlivňující následnou apoptotickou signalizaci. V příštích experimentech by bylo zajímavé se na tento proces zaměřit a zjistit, zda zablokování produkce nebo přidání exogenních sfingosinů ovlivní apoptotickou signalizaci.

Naše výsledky nevyvrátily ani zcela nepotvrdily závěry plynoucí z předchozích dvou publikací. Přidali jsme však do této problematiky zajímavou informaci o tom, že nejen endocytóza ovlivňuje TRAIlem indukovanou apoptózu, ale zvláště acidifikace endozomálních kompartmentů hraje důležitou roli během apoptotické signalizace. Tyto poznatky mohou dále přispět k porozumění rezistencí k TRAILu u nádorových buněk a případně pomoci tyto buňky senzitivovat k TRAIlem indukované apoptóze.

8. POUĀTĀ LITERA TURA

- Akazawa, Y., Mott, J. L., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Kahraman, A., Guicciardi, M. E., Meng, X. W., Kohno, S., Shah, V. H., Kaufmann, S. H., McNiven, M. A. & Gores, G. J. (2009) Death Receptor 5 Internalization Is Required for Lysosomal Permeabilization by TRAIL in Malignant Liver Cell Lines. *Gastroenterology*, **136**, 2365-2376.
- Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnhart, B. C., Murmann, A. E., Burkhardt, J. K. & Peter, M. E. (2002) Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 207-220.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. & Yuan, J. Y. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87**, 171-171.
- Andersen, M. H., Schrama, D., Straten, P. T. & Becker, J. C. (2006) Cytotoxic T cells. *Journal of Investigative Dermatology*, **126**, 32-41.
- Ashkenazi, A. (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer*, **2**, 420-430.
- Ashkenazi, A., Holland, P. & Eckhardt, S. G. (2008) Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: The potential of recombinant human apoptosis ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *Journal of Clinical Oncology*, **26**, 3621-3630.
- Ashkenazi, A., Pitti, R., Marsters, S., Ruppert, S., Donahue, C., Moore, A. & Roberts, P. (1996) Induction of apoptosis by APO-2 ligand, a new member of the TNF cytokine family. *Faseb Journal*, **10**, 1600-1600.
- Austin, C. D., Lawrence, D. A., Peden, A. A., Varfolomeev, E. E., Totpal, K., De Maziere, A. M., Klumperman, J., Arnott, D., Pham, V., Scheller, R. H. & Ashkenazi, A. (2006) Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 10283-10288.
- Balbis, A., Baquiran, G., Dumas, V. & Posner, B. I. (2004) Effect of inhibiting vacuolar acidification on insulin signaling in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 12777-12785.
- Bernard, D., Quatannens, B., Vandenbunder, B. & Abbadie, C. (2001) Rel/NF-kappa B transcription factors protect against tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by up-regulating the TRAIL decoy receptor DcR1. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 27322-27328.
- Bernardo, K., Hurwitz, R., Zenk, T., Desnick, R. J., Ferlinz, K., Schuchman, E. H. & Sandhoff, K. (1995) PURIFICATION, CHARACTERIZATION, AND BIOSYNTHESIS OF HUMAN ACID CERAMIDASE. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 11098-11102.
- Bodmer, J. L., Schneider, P. & Tschopp, J. (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*, **27**, 19-26.
- Bonifacino, J. S. & Traub, L. M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annual Review of Biochemistry*, **72**, 395-447.
- Bouralexis, S., Findlay, D. M. & Evdokiou, A. (2005) Death to the bad guys: Targeting cancer via Apo2L/TRAIL. *Apoptosis*, **10**, 35-51.
- Bowman, E. J. & Bowman, B. J. (2005) V-ATPases as drug targets. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **37**, 431-435.
- Braeuer, S. J., Buneker, C., Mohr, A. & Zwacka, R. M. (2006) Constitutively activated nuclear factor-kappa B, but not induced NF-kappa B, leads to TRAIL resistance by up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human cancer cells. *Molecular Cancer Research*, **4**, 715-728.
- Breton, S. & Brown, D. (2007) New insights into the regulation of V-ATPase-dependent proton secretion. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **292**, F1-F10.
- Cha, S. S., Kim, M. S., Choi, Y. H., Sung, B. J., Shin, N. K., Shin, H. C., Sung, Y. C. & Oh, B. H. (1999) 2.8 angstrom resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity*, **11**, 253-261.
- Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J. & Hood, L. (1997) Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappa B pathway. *Immunity*, **7**, 821-830.

- Chen, G. Q. & Goeddel, D. V. (2002) TNF-R1 signaling: A beautiful pathway. *Science*, **296**, 1634-1635.
- Cheng, Z. J., Singh, R. D., Marks, D. L. & Pagano, R. E. (2006) Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids (Review). *Molecular Membrane Biology*, **23**, 101-110.
- Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D. & Zerial, M. (1999) The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature*, **397**, 621-625.
- Clague, M. J., Urbe, S., Aniento, F. & Gruenberg, J. (1994) VACUOLAR ATPASE ACTIVITY IS REQUIRED FOR ENDOSOMAL CARRIER VESICLE FORMATION. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 21-24.
- Cordes, N., Frickz, S., Brunner, T. B., Pilarsky, C., Grutzmann, R., Siposs, B., Kloppels, G., McKenna, W. G. & Bernhard, E. J. (2007) Human pancreatic tumor cells are sensitized to ionizing radiation by knockdown of caveolin-1. *Oncogene*, **26**, 6851-6862.
- Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J. J. & Smyth, M. J. (2002) Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *Journal of Immunology*, **168**, 1356-1361.
- Cursi, S., Rufini, A., Stagni, V., Condo, I., Matafora, V., Bachi, A., Bonifazi, A. P., Coppola, L., Superti-Furga, G., Testi, R. & Barila, D. (2006) Src kinase phosphorylates caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression. *Embo Journal*, **25**, 1895-1905.
- Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. (2004) Cell death: Critical control points. *Cell*, **116**, 205-219.
- Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A. & Goodwin, R. G. (1997) The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappa B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*, **7**, 813-820.
- Denault, J. B., Bekes, M., Scott, F. L., Sexton, K. M. B., Bogyo, M. & Salvesen, G. S. (2006) Engineered hybrid dimers: Tracking the activation pathway of caspase-7. *Molecular Cell*, **23**, 523-533.
- Deveraux, Q. L. & Reed, T. C. (1999) IAP family proteins - suppressors of apoptosis. *Genes & Development*, **13**, 239-252.
- Dobrowolski, R. & De Robertis, E. M. (2012) Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **13**, 53-60.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., Rue, M., Comella, J. X. & Matias-Guiu, X. (2005) FLIP is frequently expressed in endometrial carcinoma and has a role in resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Laboratory Investigation*, **85**, 885-894.
- Du, C. Y., Fang, M., Li, Y. C., Li, L. & Wang, X. D. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, **102**, 33-42.
- Dumitru, C. A. & Gulbins, E. (2006) TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis. *Oncogene*, **25**, 5612-5625.
- Edelmann, B., Bertsch, U., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Perrotta, C., Jakob, M., Adam-Klages, S., Kabelitz, D. & Schutze, S. (2011) Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptosomes. *Embo Journal*, **30**, 379-394.
- Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B. & Walczak, H. (2007) TRAIL signalling: Decisions between life and death. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**, 1462-1475.
- Falschlehner, C., Schaefer, U. & Walczak, H. (2009) Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology*, **127**, 145-154.
- Fang, Y., Wu, N., Gan, X., Yan, W. H., Morrell, J. C. & Gould, S. J. (2007) Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *Plos Biology*, **5**, 1267-1283.
- Feig, C. & Peter, M. E. (2007) How apoptosis got the immune system in shape. *European Journal of Immunology*, **37**, S61-S70.
- Fielding, C. J. & Fielding, P. E. (1997) Intracellular cholesterol transport. *Journal of Lipid Research*, **38**, 1503-1521.
- Finnberg, N., Klein-Szanto, A. J. P. & El-Deiry, W. S. (2008) TRAU-R deficiency in mice promotes

- susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation*, **118**, 111-123.
- Fowler, S. (1969) LYSOSOMAL LOCALIZATION OF SPHINGOMYELINASE IN RAT LIVER. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **191**, 481-&.
- Futter, C. E., Pearse, A., Hewlett, L. J. & Hopkins, C. R. (1996) Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *Journal of Cell Biology*, **132**, 1011-1023.
- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P. H. & Lavrik, I. N. (2005) c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 14507-14513.
- Gonzalvez, F. & Ashkenazi, A. (2010) New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene*, **29**, 4752-4765.
- Gould, G. W. & Lippincott-Schwartz, J. (2009) New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **10**, 287-292.
- Grant, S. & Dent, P. (2004) Activation of MAP kinase pathways by TRAIL - Don't expect the obvious. *Cancer Biology & Therapy*, **3**, 302-304.
- Greene, B., Liu, S. H., Wilde, A. & Brodsky, F. M. (2000) Complete reconstitution of clathrin basket formation with recombinant protein fragments: Adaptor control of clathrin self-assembly. *Traffic*, **1**, 69-75.
- Grosse-Wilde, A., Voloshanenko, O., Bailey, S. L., Longton, G. M., Schaefer, U., Csernok, A. I., Schutz, G., Greiner, E. F., Kemp, C. J. & Walczak, H. (2008) TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development. *Journal of Clinical Investigation*, **118**, 100-110.
- Guicciardi, M. E., Bronk, S. F., Werneburg, N. W. & Gores, G. J. (2007) cFLIP(L) prevents TRAIL-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the lysosomal pathway of apoptosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **292**, G1337-G1346.
- Guicciardi, M. E. & Gores, G. J. (2009) Life and death by death receptors. *Faseb Journal*, **23**, 1625-1637.
- Heinrich, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A. & Schutze, S. (2004) Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death and Differentiation*, **11**, 550-563.
- Herrero-Martin, G., Hoyer-Hansen, M., Garcia-Garcia, C., Fumarola, C., Farkas, T., Lopez-Rivas, A. & Jaattela, M. (2009) TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *Embo Journal*, **28**, 677-685.
- Holen, I., Croucher, P. I., Hamdy, F. C. & Eaton, C. L. (2002) Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Research*, **62**, 1619-1623.
- Hu, W. H., Johnson, H. & Shu, H. B. (1999) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappa B and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 30603-30610.
- Hurley, J. H. (2008) ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Current Opinion in Cell Biology*, **20**, 4-11.
- Hymowitz, S. G., O'Connell, M. P., Ultsch, M. H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., de Vos, A. M. & Kelley, R. F. (2000) A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry*, **39**, 633-640.
- Idriss, H. T. & Naismith, J. H. (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*, **50**, 184-195.
- Jabłońska E., Kiersnowska-Rogowska B., Rogowski F., Parfińczyk A., Puzewska W. & Bukin M. (2005) Soluble form of TRAIL, Fas and FasL in the serum of patients with B-CLL. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku*, **50**, 204-208

- Janssen, E. M., Droin, N. M., Lemmens, E. E., Pinkoski, M. J., Bensinger, S. J., Ehst, B. D., Griffith, T. S., Green, D. R. & Schoenberger, S. P. (2005) CD4(+) T-cell help controls CD8(+) T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature*, **434**, 88-93.
- Jiang, X. J. & Wang, X. D. (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 31199-31203.
- Jin, Z. Y., Li, Y., Pitti, R., Lawrence, D., Pham, V. C., Lill, J. R. & Ashkenazi, A. (2009) Cullin3-Based Polyubiquitination and p62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling. *Cell*, **137**, 721-735.
- Jin, Z. Y., McDonald, E. R., Dicker, D. T. & El-Deiry, W. S. (2004) Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 35829-35839.
- Karin, M. & Lin, A. (2002) NF-kappa B at the crossroads of life and death. *Nature Immunology*, **3**, 221-227.
- Kavurma, M. M., Schoppet, M., Bobryshev, Y. V., Khachigian, L. M. & Bennett, M. R. (2008) TRAIL stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of NF-kappa B and induction of insulin-like growth factor-1 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 7754-7762.
- Kimberley, F. C. & Screaton, G. R. (2004) Following a TRAIL: Update on a ligand and its five receptors. *Cell Research*, **14**, 359-372.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. & Peter, M. E. (1995) CYTOTOXICITY-DEPENDENT APO-1 (FAS/CD95)-ASSOCIATED PROTEINS FORM A DEATH-INDUCING SIGNALING COMPLEX (DISC) WITH THE RECEPTOR. *Embo Journal*, **14**, 5579-5588.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J. & Ashkenazi, A. (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, **12**, 611-620.
- Kohlhaas, S. L., Craxton, A., Sun, X. M., Pinkoski, M. J. & Cohen, G. M. (2007) Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 12831-12841.
- Krauss, M., Kukhtina, V., Pechstein, A. & Haucke, V. (2006) Stimulation of phosphatidylinositol kinase type 1-mediated phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate synthesis by AP-2 mu-cargo complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 11934-11939.
- Kurzchalia, T. V. & Parton, R. G. (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Current Opinion in Cell Biology*, **11**, 424-431.
- Lagadic-Gossmann, D., Huc, L. & Lecreur, V. (2004) Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death and Differentiation*, **11**, 953-961.
- Lamaze, C., Chuang, T. H., Terlecky, L. J., Bokoch, G. M. & Schmid, S. L. (1996) Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature*, **382**, 177-179.
- Lamaze, C., Dujancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A. & Dautry-Varsat, A. (2001) Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Molecular Cell*, **7**, 661-671.
- Lamhamedi-Cherradi, S. E., Zheng, S. J., Maguschak, K. A., Peschon, J. & Chen, Y. H. (2003) Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL(-/-) mice. *Nature Immunology*, **4**, 255-260.
- Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P. H. & Kirchhoff, S. (2003) The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death and Differentiation*, **10**, 144-145.
- Lavrik, I. N., Golks, A. & Krammer, P. H. (2005) Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *Journal of Clinical Investigation*, **115**, 2665-2672.
- Le Roy, C. & Wrana, J. L. (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **6**, 112-126.
- Lee, K. H., Feig, C., Tchikov, V., Schickel, R., Hallas, C., Schutze, S., Peter, M. E. & Chan, A. C.

- (2006a) The role of receptor internalization in CD95 signaling. *Embo Journal*, **25**, 1009-1023.
- Lee, T. J., Lee, J. T., Park, J. W. & Kwon, T. K. (2006b) Acquired TRAIL resistance in human breast cancer cells are caused by the sustained cFLIP(L) and XIAP protein levels and ERK activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **351**, 1024-1030.
- Li, H. L., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. Y. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.
- Li, J. & Yuan, J. (2008) Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, **27**, 6194-6206.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. & Wang, X. D. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489.
- Lipardi, C., Mora, R., Colomer, V., Paladino, S., Nitsch, L., Rodriguez-Boulan, E. & Zurzolo, C. (1998) Caveolin transfection results in caveolae formation but not apical sorting of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, **140**, 617-626.
- Lippa, M. S., Strockbine, L. D., Le, T. T., Branstetter, D. G., Strathdee, C. A. & Holland, P. M. (2007) Expression of anti-apoptotic factors modulates Apo2L/TRAIL resistance in colon carcinoma cells. *Apoptosis*, **12**, 1465-1478.
- Lorz, C., Benito, A., Ucerro, A. C., Santamaria, B. & Ortiz, A. (2009) Trail and kidney disease. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, **14**, 3740-3749.
- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., FernandesAlnemri, T., Cohen, G. M. & Alnemri, E. S. (1997) Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 25417-25420.
- Maderna, P. & Godson, C. (2003) Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, **1639**, 141-151.
- Mahalingam, D., Szegezdi, E., Keane, M., de Jong, S. & Samali, A. (2009) TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treatment Reviews*, **35**, 280-288.
- Mayor, S. & Pagano, R. E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**, 603-612.
- Mellier, G., Huang, S. N., Shenoy, K. & Pervaiz, S. (2010) TRAILing death in cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, **31**, 93-112.
- Mellman, I. (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **12**, 575-625.
- Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E. & Micheau, O. (2006) Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Molecular and Cellular Biology*, **26**, 7046-7055.
- Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N. J. & Robinson, M. S. (2003) Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *Journal of Cell Biology*, **162**, 909-918.
- Mu, F. T., Callaghan, J. M., Steelemortimer, O., Stenmark, H., Parton, R. G., Campbell, P. L., McCluskey, J., Yeo, J. P., Tock, E. P. C. & Toh, B. H. (1995) EEA1, AN EARLY ENDOSOME-ASSOCIATED PROTEIN - EEA1 IS A CONSERVED ALPHA-HELICAL PERIPHERAL MEMBRANE-PROTEIN FLANKED BY CYSTEINE FINGERS AND CONTAINS A CALMODULIN-BINDING IQ MOTIF. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 13503-13511.
- Muhlberg, A. B., Warnock, D. E. & Schmid, S. L. (1997) Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *Embo Journal*, **16**, 6676-6683.
- Nakajima, H. & Oka, T. (1997) Analysis of biochemical and biological functions of Fas-ligand (FasL) and Fas on activated T cells in allo-immune response. *Transplantation Proceedings*, **29**, 1096-1100.
- Niehrs, C. & Boutros, M. (2010) Trafficking, Acidification, and Growth Factor Signaling. *Science Signaling*, **3**.
- Norkin, L. C., Anderson, H. A., Wolfrom, S. A. & Oppenheim, A. (2002) Caveolar endocytosis of Simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *Journal of Virology*, **76**, 5156-5166.

- Page, L. J. & Robinson, M. S. (1995) TARGETING SIGNALS AND SUBUNIT INTERACTIONS IN COATED VESICLE ADAPTER COMPLEXES. *Journal of Cell Biology*, **131**, 619-630.
- Pan, G. H., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G. L., Gentz, R. & Dixit, V. M. (1997a) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, **277**, 815-818.
- Pan, G. H., Orourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J. & Dixit, V. M. (1997b) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, **276**, 111-113.
- Pelkmans, L., Burli, T., Zerial, M. & Helenius, A. (2004) Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell*, **118**, 767-780.
- Pelkmans, L. & Zerial, M. (2005) Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature*, **436**, 128-133.
- Phillips, D. C., Martin, S., Doyle, B. T. & Houghton, J. A. (2007) Sphingosine-induced apoptosis in rhabdomyosarcoma cell lines is dependent on pre-mitochondrial bax activation and post-mitochondrial caspases. *Cancer Research*, **67**, 756-764.
- Platta, H. W. & Stenmark, H. (2011) Endocytosis and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, **23**, 393-403.
- Pop, C. & Salvesen, G. S. (2009) Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 21777-21781.
- Ramanan, V., Agrawal, N. J., Liu, J., Engles, S., Toy, R. & Radhakrishnan, R. (2011) Systems biology and physical biology of clathrin-mediated endocytosis. *Integrative Biology*, **3**, 803-815.
- Razani, B., Woodman, S. E. & Lisanti, M. P. (2002) Caveolae: From cell biology to animal physiology. *Pharmacological Reviews*, **54**, 431-467.
- Reinehr, R., Sommerfeld, A., Keitel, V., Grether-Beck, S. & Haussinger, D. (2008) Amplification of CD95 activation by caspase 8-induced endosomal acidification in rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 2211-2222.
- Riccioni, R., Pasquini, L., Mariani, G., Saulle, E., Rossini, A., Diverio, D., Pelosi, E., Vitale, A., Chierichini, A., Cedrone, M., Foa, R., Lo Coco, F., Peschle, C. & Testa, U. (2005) TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. *Haematologica-the Hematology Journal*, **90**, 612-624.
- Riedl, S. J. & Salvesen, G. S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**, 405-413.
- Riedl, S. J. & Shi, Y. G. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**, 897-907.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, **122**, 735-749.
- Rossin, A., Derouet, M., Abdel-Sater, F. & Hueber, A. O. (2009) Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling. *Biochemical Journal*, **419**, 185-192.
- Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A. & De Camilli, P. (2006) GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature*, **441**, 528-531.
- Rusk, N., Le, P. U., Mariggio, S., Guay, G., Lurisci, C., Nabi, I. R., Corda, D. & Symons, M. (2003) Synaptojanin 2 functions at an early step of clathrin-mediated endocytosis. *Current Biology*, **13**, 659-663.
- Ryu, B. K., Lee, M. G., Chi, S. G., Kim, Y. H. & Park, J. H. (2001) Increased expression of cFLIP(L) in colonic adeno carcinoma. *Journal of Pathology*, **194**, 15-19.
- Sargiacomo, M., Scherer, P. E., Tang, Z. L., Kubler, E., Song, K. S., Sanders, M. C. & Lisanti, M. P. (1995) OLIGOMERIC STRUCTURE OF CAVEOLIN - IMPLICATIONS FOR CAVEOLAE MEMBRANE ORGANIZATION. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 9407-9411.
- Savarino, A., Boelaert, J. R., Cassone, A., Majori, G. & Cauda, R. (2003) Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infectious Diseases*, **3**, 722-727.
- Sawada, M., Nakashima, S., Kiyono, T., Yamada, J., Hara, S., Nakagawa, M., Shinoda, J. & Sakai, N. (2002) Acid sphingomyelinase activation requires caspase-8 but not P53 nor reactive oxygen species during Fas-induced apoptosis in human glioma cells. *Experimental Cell Research*,

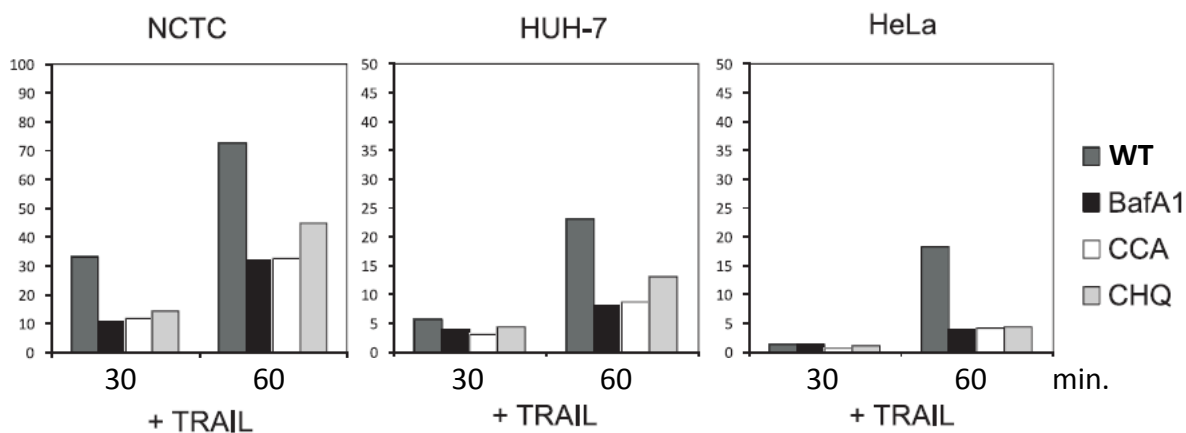
273, 157-168.

- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Merkel, O., Jakob, M., Hallas, C., Kruse, M. L., Groitl, P., Lehn, A., Hildt, E., Held-Feindt, J., Dobner, T., Kabelitz, D., Kronke, M. & Schutze, S. (2006) Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism. *Journal of Clinical Investigation*, **116**, 2901-2913.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwander, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D. & Schutze, S. (2004) Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: Internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity*, **21**, 415-428.
- Schutze, S., Machleidt, T., Adam, D., Schwandner, R., Wiegmann, K., Kruse, M. L., Heinrich, M., Wickel, M. & Kronke, M. (1999) Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 10203-10212.
- Secchiero, P., Gonelli, A., Carnevale, E., Milani, D., Pandolfi, A., Zella, D. & Zauli, G. (2003) TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. *Circulation*, **107**, 2250-2256.
- Sedger, L. M., Glaccum, M. B., Schuh, J. C. L., Kanaly, S. T., Williamson, E., Kayagaki, N., Yun, T., Smolak, P., Le, T., Goodwin, R. & Gliniak, B. (2002) Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *European Journal of Immunology*, **32**, 2246-2254.
- Semerdjieva, S., Shortt, B., Maxwell, E., Singh, S., Fonarev, P., Hansen, J., Schiavo, G., Grant, B. D. & Smythe, E. (2008) Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *Journal of Cell Biology*, **183**, 499-511.
- Seol, D. W. & Billiar, T. R. (2000) Cysteine 230 modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activity. *Cancer Research*, **60**, 3152-3154.
- Sharma, D. K., Brown, J. C., Choudhury, A., Peterson, T. E., Holicky, E., Marks, D. L., Simari, R., Parton, R. G. & Pagano, R. E. (2004) Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Molecular Biology of the Cell*, **15**, 3114-3122.
- Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C. L., Baker, K., Wood, W. I., Goddard, A. D., Godowski, P. & Ashkenazi, A. (1997) Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*, **277**, 818-821.
- Shi, J., Zheng, D. X., Liu, Y. X., Sham, M. H., Tam, P., Farzaneh, F. & Xu, R. A. (2005) Overexpression of soluble TRAIL induces apoptosis in human lung adenocarcinoma and inhibits growth of tumor xenografts in nude mice. *Cancer Research*, **65**, 1687-1692.
- Shipman, C. M. & Croucher, P. I. (2002) Osteoprotegerin (OPG) is a soluble decoy receptor for TRAIL/Apo2L and can inhibit TRAIL/Apo2L-induced apoptosis of human myeloma cells in vitro. *Blood*, **100**, 208A-208A.
- Shipman, C. M. & Croucher, P. I. (2003) Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Research*, **63**, 912-916.
- Smyth, M. J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J. J., van den Brink, M. R. M. & Yagita, H. (2003) Nature's TRAIL - On a path to cancer immunotherapy. *Immunity*, **18**, 1-6.
- Sprick, M. R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M. A. & Walczak, H. (2002) Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *Embo Journal*, **21**, 4520-4530.
- Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J. A., Binder, B. R. & Lipp, J. (1998) Nuclear factor (NF)-kappa B-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, **188**, 211-216.
- Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **10**, 513-525.
- Sun-Wada, G. H., Wada, Y. & Futai, M. (2003) Lysosome and lysosome-related organelles responsible for specialized functions in higher organisms, with special emphasis on vacuolar-

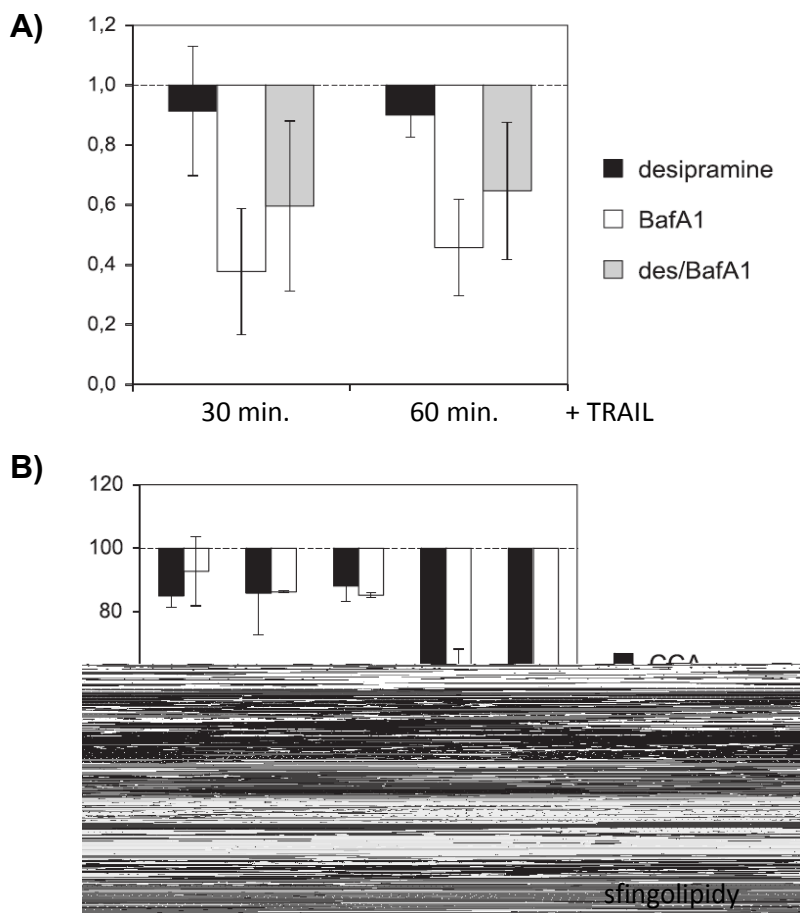
- type proton ATPase. *Cell Structure and Function*, **28**, 455-463.
- Suzuki, E., Handa, K., Toledo, M. S. & Hakomori, S. (2004) Sphingosine-dependent apoptosis: A unified concept based on multiple mechanisms operating in concert. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 14788-14793.
- Taelman, V. F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J. L., Fuentealba, L. C., Vorwald, P. P., Gumper, I., Sabatini, D. D. & De Robertis, E. M. (2010) Wnt Signaling Requires Sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside Multivesicular Endosomes. *Cell*, **143**, 1136-1148.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H. & Okumura, K. (2001) Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature Medicine*, **7**, 94-100.
- Takeda, K., Stagg, J., Yagita, H., Okumura, K. & Smyth, M. J. (2007) Targeting death-inducing receptors in cancer therapy. *Oncogene*, **26**, 3745-3757.
- Tatin, F., Varon, C., Genot, E. & Moreau, V. (2006) A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. *Journal of Cell Science*, **119**, 769-781.
- Tchikov, V., Bertsch, U., Fritsch, J., Edelmann, B. & Schutze, S. (2011) Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways. *European Journal of Cell Biology*, **90**, 467-475.
- Tchikov, V. & Schutze, S. (2008) Immunomagnetic isolation of tumor necrosis factor receptosomes. *Programmed Cell Death, General Principles for Studying Cell Death, Pt A*, **442**, 101-123.
- Tecchio, C., Huber, V., Scapini, P., Calzetti, F., Margotto, D., Todeschini, G., Pilla, L., Martinelli, G., Pizzolo, G., Rivoltini, L. & Cassatella, M. A. (2004) IFN alpha-stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood*, **103**, 3837-3844.
- Truneh, A., Sharma, S., Silverman, C., Khandekar, S., Reddy, M. P., Deen, K. C., McLaughlin, M. M., Srinivasula, S. M., Livi, G. P., Marshall, L. A., Alnemri, E. S., Williams, W. V. & Doyle, M. L. (2000) Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors - DR5 is the highest affinity receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 23319-23325.
- Vaccari, T., Duchi, S., Cortese, K., Tacchetti, C. & Bilder, D. (2010) The vacuolar ATPase is required for physiological as well as pathological activation of the Notch receptor. *Development*, **137**, 1825-1832.
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W. & Vandenabeele, P. (2002) The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death and Differentiation*, **9**, 20-26.
- Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D. & Ashkenazi, A. (2005) Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 40599-40608.
- Voelkel-Johnson, C., Hannun, Y. A. & El-Zawahry, A. (2005) Resistance to TRAIL is associated with defects in ceramide signaling that can be overcome by exogenous C-6-ceramide without requiring down-regulation of cellular FLICE inhibitory protein. *Molecular Cancer Therapeutics*, **4**, 1320-1327.
- Vu, A. T., Chen, X., Xie, Y., Kamijo, S., Ushio, H., Kawasaki, J., Hara, M., Ikeda, S., Okumura, K., Ogawa, H. & Takai, T. (2011) Extracellular Double-Stranded RNA Induces TSLP via an Endosomal Acidification- and NF-kappa B-Dependent Pathway in Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, **131**, 2205-2212.
- Wagner, K. W., Punnoose, E. A., Januario, T., Lawrence, D. A., Pitti, R. M., Lancaster, K., Lee, D., von Goetz, M., Yee, S. F., Totpal, K., Huw, L., Katta, V., Cavet, G., Hymowitz, S. G., Amler, L. & Ashkenazi, A. (2007) Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nature Medicine*, **13**, 1070-1077.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V. & Baldwin, A. S. (1998) NF-kappa B antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, **281**, 1680-1683.

- Waterhouse, N. J., Ricci, J. E. & Green, D. R. (2002) And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie*, **84**, 113-121.
- Werneburg, N. W., Guicciardi, M. E., Bronk, S. F., Kaufmann, S. H. & Gores, G. J. (2007) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activates a lysosomal pathway of apoptosis that is regulated by Bcl-2 proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 28960-28970.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A. & Goodwin, R. G. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, **3**, 673-682.
- Woo, C. H., Kim, T. H., Choi, J. A., Ryu, H. C., Lee, J. E., You, H. J., Bae, Y. S. & Kim, J. H. (2006) Inhibition of receptor internalization attenuates the TNF alpha-induced ROS generation in non-phagocytic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **351**, 972-978.
- Woodcock, J. (2006) Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis. *Iubmb Life*, **58**, 462-466.
- Xu, G. W. & Shi, Y. F. (2007) Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Research*, **17**, 759-771.
- Zhang, X. D., Franco, A., Myers, K., Gray, C., Nguyen, T. & Hersey, P. (1999) Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Research*, **59**, 2747-2753.
- Zhang, X. D., Franco, A. V., Nguyen, T., Gray, C. P. & Hersey, P. (2000) Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *Journal of Immunology*, **164**, 3961-3970.
- Zhang, Y. Q., Yoshida, T. & Zhang, B. L. (2009) TRAIL induces endocytosis of its death receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, **8**, 917-922.
- Zhang, Y. Q. & Zhang, B. L. (2008) TRAIL Resistance of Breast Cancer Cells Is Associated with Constitutive Endocytosis of Death Receptors 4 and 5. *Molecular Cancer Research*, **6**, 1861-1871.
- Zhao, J., Lu, Y. X. & Shen, H. M. (2012) Targeting p53 as a therapeutic strategy in sensitizing TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Letters*, **314**, 8-23.

9. DODATKOVÁ DATA

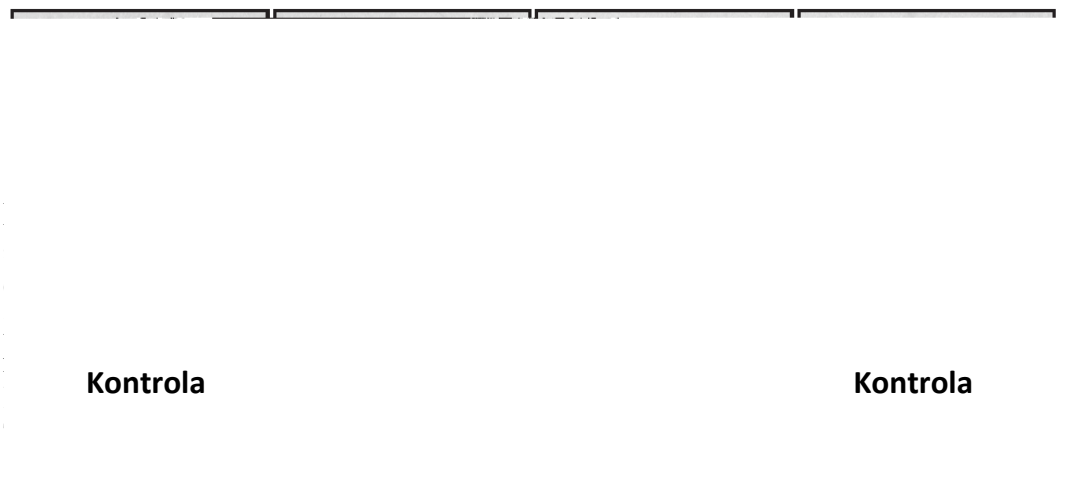


Dodatkový obrázek 1. Vliv inhibice acidifikace na aktivaci kaspázy-3 u dalších k TRAILu citlivých buněčných linií. Buněčné linie různého původu (NCTC - keratinocyty, Huh-7 - hepatocelulární karcinom, HeLa - karcinom děložního čípku) byly preinkubovány s inhibitory V-ATPázy (baf A1- 20nM, CCA A-20 nM) po dobu 30 minut a s lyzomotropickým činidlem (CHQ- 50 μ M) po dobu 1 hodiny. Poté byl na 30 a 60 minut aplikován TRAIL (200 ng/ml). Buňky byly barveny protilátkou M30-FITC a analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Na grafech je znázorněno procento M30-pozitivních buněk z celkové populace. U všech testovaných linií došlo, po snížení endozomálního pH, k výraznému poklesu hladiny apoptotických buněk vůči kontrole (WT). Graf ukazuje průměr ze dvou nezávislých pokusů.



Dodatkový obrázek 2. Vliv inhibice kyselé sfingomyelinázy (ASM) a/nebo endozomální acidifikace na apoptózu a obsah sfingolipidů. A) Buňky linie Colo-206F byly inkubovány s inhibítozem acidifikace (baf A1, 20 nM) po dobu 30 minut, s inhibítozem ASM (desipramine-20 μ M) po dobu 1 hodiny nebo s jejich kombinací. Následně byly buňky inkubovány s TRAIlem (30, 60 minut; 200ng/ml). Aktivace kaspázy-3 byla detekována protilátkou M30-FITC a měřena pomocí průtokové cytometrie. U buněk s inhibovanou V-ATPázou došlo opět k výraznému poklesu hladiny apoptotických buněk. Inhibice ASM neměla na apoptózu téměř žádný vliv a naopak zvýšila hladinu aktivované kaspázy-3 při souběžné inhibici V-ATPázy. Na grafu je znázorněn poměr M30-positivních buněk vůči neovlivněným buňkám. Data pocházejí ze tří nezávislých experimentů, zobrazen je průměr a SD.

B) Polovina vzorků linie Colo-206F byla inkubována s bafilomycinem (20 nM, 30 min), inhibítozem ASM desipraminem (20 μ M, 1 hod.) a s kombinací obou inhibítozů. Buňky byly spočteny a příslušný počet (přibližně 10^9 buněk) byl analyzován pomocí HPLC-MS pro zjištění hladiny buněčných sfingolipidů. Měřena byla hladina ceramidů [C16, C18 a C24, sfingosinu [SO a sfingosin-1-fosfátu [S1P. Hladina ceramidů klesla po inhibici V-ATPázy i ASM přibližně pouze o 5-15%. Nejvýraznější snížení nastalo po inhibici V-ATPázy u sfingosinu a sfingosin-1-fosfátu. Také inhibice ASM měla vliv, i když méně než baf A1, na hladinu SO a S1P. Graf znázorňuje hladinu buněčných sfingolipidů po dané inhibici vzhledem ke kontrolním buňkám. Byla provedena dvě nezávislá měření.



Dodatkový obrázek 3. Vliv inhibitorů V-ATPázy na vybrané komponenty NF- κ B dráhy a MAP kinázové signalizace. Buňky Colo-206F byly preinkubovány 30 minut s inhibitory V-ATPázy (CCA, 20 nM; BafA1, 20 nM). Poté byl na tyto vzorky i na neinhibované buňky aplikován TRAIL (200ng/ml) nebo TNF- α (20 ng/ml) v daných časových bodech (15-180 minut). Celkové lyzáty byly analyzovány metodou western blotting. Rekombinantní TNF α byl použit jako pozitivní kontrola pro aktivaci NF- κ B dráhy. Nezaznamenali jsme žádné reprodučibilní snížení těchto drah po inhibici V-ATPázy během TRAILem indukované apoptózy .