**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

**Adéla Kábelová**

# Indukce a průběh programované buněčné smrti v nádorových buňkách po aplikaci taxanů

Induction and course of programmed cell death in cancer cells after taxane application

**Bakalářská práce**

Školitel: Mgr. Michael Jelínek

Praha, 2013

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Michaelovi Jelínkovi za trpělivost, rady a cenné připomínky k této práci. Dále patří mé díky všem, kteří mě podporovali nejen při psaní závěrečné práce, ale i během celého vysokoškolského studia.

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

V Praze, 21. 8. 2013

Podpis

## Abstrakt

Taxany jsou třídou běžně užívaných protinádorových léčiv zvláště účinných u nádorových onemocnění prsu, vaječníku, prostaty či plic. Taxany se váží se na β-tubulinovou podjednotku mikrotubulů, čímž vedou k jejich stabilizaci a inhibici depolymerizace. Takovéto mikrotubuly nejsou schopny tvořit funkční mitotické vřeténko a dochází k zablokování buněčného cyklu v G2/M fázi a následné apoptóze. Některé buňky si však k taxanům vyvinuly různé mechanismy rezistence. Ty mohou souviset s cílovým místem pro vazbu taxanů, tj. mikrotubuly nebo mohou být výsledkem zvýšené exprese specifických přenašečů, které odčerpávají taxany ven z buňky. Další typy rezistence jsou spojeny s procesem programované buněčné smrti (PCD), konkrétně s proteiny, které se po aplikaci taxanů podílí na jejím zdárném průběhu. K těmto proteinům patří rodina Bcl-2, která reguluje iniciaci PCD udržováním integrity membrány mitochondrií a endoplasmatického retikula a jejichž aktivita může být taxany přímo či nepřímo ovlivňována. Výkonnou složkou PCD jsou kaspázy, kde zvláště důležitou se zdá být kaspáza-2 aktivovaná v důsledku taxany-indukovaného cytoskeletárního poškození. V některých případech mohou taxany vést k buněčné smrti nezávisle na kaspázách. Zvláštní úlohu má protein p53, který se do apoptózy indukované taxany zapojuje pouze při aplikaci nízkých koncentrací taxanu.

## Klíčová slova

Taxany, kaspázy, endoplasmatické retikulum, Bcl-2 proteiny, rezistence, mikrotubuly

## Abstract

The taxanes are a class of commonly used anticancer agents, which are very effective in treatment of breast, ovarian, prostate or lung cancer. Taxanes bind to the β-tubulin subunit of microtubules and lead to their stabilization and inhibition of depolymerization. Such microtubules lose their function to form mitotic spindle, thus arresting cells in G2/M phase and resulting in apoptosis. Unfortunately some cells are able to escape from taxanes-induced apoptosis by developing various mechanisms of resistance including alteration in taxanes target microtubules or upregulation of specific transporters that pump the drug out of cells. Other types of resistance are connected with process of programmed cell death (PCD), especially with proteins that after taxane application participate in its successful progress. Taxanes can directly or indirectly modify the activity of Bcl-2-family proteins that control mitochondrial and endoplasmic reticulum integrity, thus regulating the initiation of PCD. Caspases are executioners of PCD and caspase-2 activated by cytoskeletal disruption seems to be especially important in taxanes-induced apoptosis. In some cases can taxane treatment also result in caspase-independent cell death. Special role has protein p53 that seems to be involved only in apoptosis caused by low taxanes concentration.

## Key words

Taxanes, caspases, endoplasmic reticulum, Bcl-2 proteins, resistance, microtubules

# Obsah

**Abstrakt** ... 3

**Abstract** ... 4

**Obsah** ... 5

**Seznam zkratek** ... 7

**1 Úvod** ... 8

**2 Mikrotubulární systém buňky** ... 9

2.1 Interakce taxanů s mikrotubuly ... 9

**3 Rezistence nádorových buněk k taxanům** ... 11

3.1 Rezistence k taxanům spojená s mikrotubuly ... 11

3.1.1 Změny v expresi isotypů β-tubulinové podjednotky ... 11

3.1.2 Mutace v genech kódujících β-tubulinové podjednotky ... 12

3.1.3 Rezistence spojená s α-tubulinovou podjednotkou ... 13

3.2 Rezistence k taxanům spojená s ABC přenašeči ... 13

**4 Programovaná buněčná smrt v nádorových buňkách po aplikaci taxanů a související mechanismy rezistence** ... 15

4.1 p53 v apoptóze indukované taxany ... 15

4.2 Proteiny Bcl-2 rodiny ... 16

4.2.1 Vliv taxanů na protein Bcl-2 ... 17

4.2.2 Vliv taxanů na další vybrané členy Bcl-2 rodiny ... 19

4.3 Taxany a jejich efekt na mitochondrie ... 20

4.4 Aktivace kaspáz po aplikaci taxanů ... 21

4.4.1 Iniciační kaspázy aktivované taxany ... 22

4.4.1.1 Kaspáza-2 ... 22

4.4.1.2 Kaspáza-8 a -10 ... 23

4.4.1.3 Kaspáza-9 ..... 24
4.4.2 Exekutivní kaspázy-3, -6 a -7 aktivované taxany ..... 25
**5 Neapoptotické mechanismy buněčné smrti indukované taxany** ..... 26
5.1 Nekróza ..... 26
5.2 Mitotická katastrofa ..... 27
**6 Taxany a endoplasmatické retikulum** ..... 28
**7 Závěr** ..... 30
**8 Seznam literatury** ..... 32

## Seznam zkratek

| | |
|---|---|
| **ABC** | (ATP)-binding-cassette |
| **Apaf-1** | apoptotický peptidázu aktivující faktor-1 |
| **AIF** | faktor indukující apoptózu |
| **BH** | Bcl-2 homologní |
| **dATP** | (deoxy)-adenosintrifosfát |
| **DED** | Death effector domain |
| **ER** | endoplasmatické retikulum |
| **FADD** | Fas-associated death domain |
| **Fas** | Apoptosis stimulating fragment |
| **GDP/GTP** | guanosindifosfát/guanosintrifosfát |
| **IP3R** | inositol-1,4,5-trisfosfát receptor |
| **IAPs** | proteiny inhibující apoptózu |
| **JNK** | c-Jun-$NH_2$-terminální kináza |
| **HER2/neu** | receptor 2 pro lidský epidermální růstový faktor |
| **MDR** | receptory mnohočetné lékové rezistence |
| **MRPs** | proteiny spojené s mnohočetnou lékovou rezistencí |
| **GTP-BD** | GTP-vazebná doména |
| **PIDD** | p53-induced death domain |
| **PTP** | mitochondriální pór (permeability transition pore) |
| **RAIDD** | RIP associated Ich-1/CED homologous protein with death domain |
| **siRNA** | small interfering RNA |
| **SERCA** | sarco/endoplasmic reticulum $Ca^{2+}$ ATPase |
| **SMAC** | Second mitochondria-derived activator of caspases |
| **UPR** | unfolded protein response |
| **VDAC** | napěťově ovládaný aniontový kanál |
| **XIAP** | X-linked IAP |

# 1 Úvod

Přestože v posledních letech výzkum v oblasti nádorové problematiky značně pokročil, patří nádorová onemocnění společně s onemocněními cévní soustavy k nejčastějším příčinám úmrtí v rozvinutých zemích. Každým rokem je některým typem nádorového onemocnění nově diagnostikováno přibližně 13 milionů lidí a prognózy jsou takové, že v příštích dvaceti letech by se tyto počty mohly téměř zdvojnásobit[1]. Je tedy žádoucí snažit se porozumět nejen mechanismům samotné kancerogeneze, ale i dále rozvíjet výzkum v oblasti možné nádorové terapie, který by v budoucnu pomohl snížit úmrtnost a zlepšit kvalitu života onkologických pacientů.

Taxany jsou skupinou přírodních či syntetických cytostatik rutinně používaných v léčbě některých typů nádorových onemocnění. První objevený a dosud nejužívanější taxanový lék paclitaxel, obchodním názvem Taxol®, je rostlinný alkaloid izolovaný z kůry západoamerického tisu *(Taxus brevifolia*) a byl v podstatě náhodně objeven v 60. letech 20. století v rámci programu, jehož účelem bylo testovat tisíce vzorků rostlin jako potenciální protinádorové léky. Další podobnou látkou je docetaxel, obchodním názvem Taxotere®, který je semisynteticky připravován z prekurzoru získaného z jehlic tisu červeného *(Taxus baccata)*. V posledních letech se začíná objevovat řada derivátů taxanu, tzv. taxanů druhé generace, které by v budoucnu mohly klasické taxany nahradit. Přestože jsou tyto čistě syntetické taxany zatím spíše *in vitro* záležitostí, už dnes mnoho studií poukazuje na jejich zvýšenou účinnost u rezistentních nádorových linií v porovnání s taxany klasickými.

Dříve byly taxany díky unikátnímu mechanismu, kterým indukují buněčnou smrt používány jako léky tzv. druhé volby tehdy, když selhávaly běžné chemoterapeutické metody. Dnes jsou taxany běžně podávány jak samostatně, tak i v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky při nádorových onemocněních prsu, vaječníku, prostaty nebo plic a jejich účinnost u řady dalších typů nádorů se testuje. Taxany společně s dalšími běžně užívanými cytostatiky vinca alkaloidy patří do skupiny látek označované jako mitotické inhibitory, neboť potlačují dynamiku mikrotubulárního systému, který v buňce zastává řadu funkcí včetně mitózy a v důsledku jejich narušení dochází k apoptóze.

[1] http://www.wcrf.org/cancer_statistics/index.php

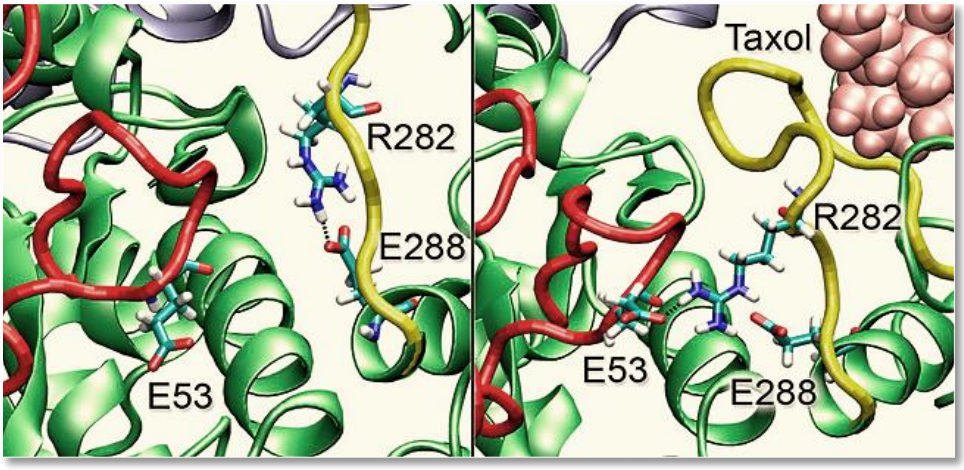
Přesto, že je taxanům věnována pozornost již delší dobu a jsou předmětem intenzivního výzkumu, přesný mechanismus jejich působení není dosud znám. Tato práce si klade za cíl shrnout dosavadní poznatky o mechanismech, kterými se indukuje a realizuje buněčná smrt po aplikaci taxanů.

# 2 Mikrotubulární systém buňky

Mikrotubuly jsou polymery složené z dimerních podjednotek α- a β-tubulinu, které v rámci buňky zastávají řadu funkcí např. v buněčné signalizaci, vezikulárním transportu či buněčném dělení. Během mitózy vytváří mikrotubuly bipolární mitotické vřeténko, které se napojuje na chromozomy a podílí se na jejich přesné segregaci do dceřiných buněk. α- i β-tubulin mají na C-terminálním konci vazebnou doménu pro guanosintrifosfát (GTP-BD), který se k α-tubulinu váže ireverzibilně, zatímco na β-tubulinu může být GTP hydrolyzováno na guanosindifosfát (GDP). Vazba GTP či GDP k β-tubulinu zásadně ovlivňuje konformaci tubulinových dimerů a tím i stabilitu celého mikrotubulu. Při vazbě GTP mají dimerní podjednotky „rovnou" konformaci, vazby mezi sousedními protofilamenty jsou pevné a mikrotubuly stabilní. Po hydrolýze GTP se jednotlivé dimery zakřivují, čímž se oslabují interakce mezi protofilamety a dochází k depolymerizaci. Pro funkci mikrotubulů je nezbytná jejich vysoce dynamická struktura a její potlačení je pro buňky často letální (shrnuto v Downing and Nogales, 1998).

## 2.1 Interakce taxanů s mikrotubuly

Vazba taxanů k mikrotubulům je reverzibilní se stechiometrií jedna molekula taxanu na tubulinový dimer (Diaz and Andreu, 1993). Vazebné místo pro taxany se nachází na N-terminálním konci β-tubulinové podjednotky v blízkosti M-smyčky, která se podílí na tvorbě laterálních kontaktů s β-tubulinovou podjednotkou v sousedním protofilamentu. Za nepřítomnosti taxanů spolu interagují aminokyselinové zbytky $Glu_{288}$ a $Arg_{282}$, nacházející se oba na M-smyčce stejné β-tubulinové podjednotky. Po navázání taxanu na β-tubulin dochází k vytěsnění M-smyčky směrem dolů, zaniká původní vazba a vzniká nová mezi $Arg_{282}$ na M-smyčce a $Glu_{53}$ na H1-S2-smyčce sousedního β-tubulinu (Mitra and Sept, 2008) (viz Obr. 1.). Důsledkem vazby taxanu na β-tubulin je tedy vznik vazby mezi sousedními tubulinovými dimery, která vede k posílení vazeb mezi protofilamenty a stabilizaci mikrotubulů.




**Obr. 1. Interakce mezi M- a H1-S2-smyčkou za nepřítomnosti taxanu (vlevo) a po jeho navázání (vpravo).** Bez přítomnosti taxanu vzniká na β-tubulinové podjednotce iontová vazba mezi $Arg_{282}$ a $Glu_{288}$ v rámci M-smyčky (žlutě). Po navázání taxanu je M-smyčka posunuta směrem dolů a vzniká nová vazba mezi $Arg_{282}$ na M-smyčce a $Glu_{53}$ na H1-S2-smyčce (červeně) sousedního β-tubulinu (převzato z Mitra and Sept, 2008).

Současně vede navázání taxanu ke zvýšení flexibility a dynamiky v okolí GTP-BD, které dokáže kompenzovat a překonat konformační změny tubulinových dimerů, které následují po hydrolýze GTP. Ty si tak zachovávají „rovnou" konformaci i při navázání GDP, čímž omezují tendenci mikrotubulů se depolymerizovat (Mitra and Sept, 2008). Tuto teorii potvrzují i výsledky Elie-Caille a kol. (2007), které ukazují, že protofilamenta s navázanými taxany mají podobnou konformaci jako protofilamenta s navázaným GTP a liší se tak od protofilament s navázaným GDP.

Potlačení konformačních změn spojených s hydrolýzou GTP indukují taxany jen tehdy, pokud jsou přidány k tubulinovým dimerům již před nukleací. Pokud jsou taxany přidány k mikrotubulům až v průběhu nukleace, dochází pouze k nepatrnému posunu pozice tubulinových dimerů mezi sousedními protofilamenty (Arnal and Wade, 1995). Tento jev lze vysvětlit posunutím M-smyčky směrem dolů a změnou v laterálních kontaktech mezi protofilamenty. Zmenšení vzdálenosti a změna úhlu mezi protofilametny vlivem taxanů vede také ke snížení počtu protofilament v kruhu, kdy se za přítomnosti taxanů preferenčně tvoří mikrotubuly s 12 protofilamenty v kruhu namísto běžných 13 (Andreu et al., 1994).

Taxany ovlivňují mikrotubulární systém již při použití nanomolární koncentrace. Urychlují polymeraci tubulinu, stabilizují vzniklé mikrotubuly a brání jejich depolymerizaci, čímž narušují jejich dynamickou nestabilitu. Takovéto mikrotubuly jsou velmi stálé i v destabilizujících podmínkách, např. za nízké teploty nebo za přítomnosti

$Ca^{2+}$ (Schiff et al., 1979). Taxany také snižují kritickou koncentraci tubulinových dimerů nutných pro iniciaci nukleace (Wilson et al., 1985) a dokáží iniciovat nukleaci za nepřítomnosti GTP či proteinů asociovaných s mikrotubuly (Schiff and Horwitz, 1981).

Důsledkem aplikace taxanů je shlukování mikrotubulů během interfáze a tvorba multipolárního mitotického vřeténka během mitózy, které není schopné zajistit segregaci chromozomů a tím i postup do anafáze. Výsledkem je zastavení buněčného cyklu a akumulace buněk G2/M fázi a zahájení apoptózy (Yvon et al., 1999).

# 3 Rezistence nádorových buněk k taxanům

Rezistence nádorových buněk je limitujícím faktorem úspěšné chemoterapie. V souvislosti s taxany bylo popsáno několik mechanismů primární (vrozené), především však sekundární (získané) rezistence, která v případě relapsu nádorového onemocnění komplikuje léčbu. Vznik rezistence nádorových buněk k taxanům je dáván do souvislosti se změnami v metabolismu taxanů, s cílovým místem pro vazbu taxanů, tj. mikrotubuly, může být výsledkem zvýšené exprese specifických přenašečů, které odčerpávají taxany ven z buňky či může být důsledkem mutací a změn v expresi proteinů regulujících a realizujících buněčnou smrt. Poslední tři zmíněné mechanismy budou diskutovány dále.

## 3.1 Rezistence k taxanům spojená s mikrotubuly

### 3.1.1 Změny v expresi isotypů β-tubulinové podjednotky

β-tubulin je kódován širokou multigenovou rodinou. U obratlovců bylo identifikováno minimálně šest různých isotypů β-tubulinu, které se exprimují v závislosti na typu tkáně. I a IVb třída se nachází ve všech typech tkání, třídy II, III a IVa jsou exprimovány primárně v mozku, VI třída je charakteristická pro buňky hematopoetických tkání a má nízký stupeň homologie s ostatními třídami (shrnuto v Sullivan, 1988).

U nádorových buněk rezistentních k taxanům bylo pozorováno jednak snížení samotné exprese β-tubulinu (Wang and Cabral, 2005) a také změny v expresi β-tubulinových isotypů. Konkrétně např. zvýšená exprese II a III třídy u karcinomu slinivky (Liu et al., 2001), I, III a IVa třídy u ovariálního karcinomu (Kavallaris et al., 1997), I, III a IV třídy u prsního karcinomu (Galmarini et al., 2008) či III a IVa třídy u

nádoru prostaty (Ranganathan et al., 1998). Blade a kol. (1999) ve své studii dokázali, že jediný tubulinový isotyp, jehož zvýšenou expresí lze indukovat rezistenci k taxanům je βIII-tubulin, což je v souladu s pozorováním, že tento isotyp je nejčastěji nadměrně exprimovaným isotypem u buněk rezistentních k taxanům a minimálně u buněk plicního karcinomu je míra jeho exprese vhodným markerem predikujícím úspěšnost léčby (Seve et al., 2005).

Jednotlivé β-tubulinové isotypy mají různý vliv na dynamiku a stabilitu mikrotubulů. V porovnání s ostatními isotypy vyžadují např. mikrotubuly složené primárně z βIII-tubulinu vyšší kritickou koncentraci tubulinu pro zahájení nukleace. Mají také nižší polymerační schopnost a jsou více dynamické. Vzhledem k tomu, že vazebné místo pro taxany se nachází pouze na polymerovaných mikrotubulech, představují tak nádorové buňky s vyšší dynamikou mikrotubulů a méně stabilními polymery selekční výhodu vůči účinku taxanů (Kamath et al., 2005). Tyto buňky navíc často pro svou normální funkci vyžadují určitou koncentraci taxanů, které zvýšenou dynamiku mikrotubulů částečně inhibují (Goncalves et al., 2001).

Na druhou stranu některé studie žádný zásadní vliv zvýšené exprese některých β-tubulinových isotypů na rezistenci k taxanům neprokázaly (Dumontet et al., 1996) a úloha jednotlivých β-tubulinových isotypů ve vzniku rezistence je tak předmětem dalšího zkoumání.

### 3.1.2 Mutace v genech kódujících β-tubulinové podjednotky

Gen kódující u většiny buněk majoritní βI-tubulin se nachází v oblasti chromozomu 6p21.3 a skládá ze čtyř exonů. Vazebné místo pro taxany je kódováno exony 1 a 2, zatímco 4 exon nese GTP-BD. Mutace, nejčastěji substituční či deleční, nacházející se v těchto exonech jsou dávány do souvislosti se vznikem rezistence nádorových buněk k taxanům. Např. studie Hari a kol. (2006) ukazuje, že mutace ve vazebném místě pro taxany ($Asp_{26}$→Glu) snižují afinitu k taxanům a současně vedou i ke zvýšení dynamiky mikrotubulů. Obdobné typy mutací zvyšující mikrotubulární dynamiku detekovali Giannakakou a kol. (1997) u ovariálního karcinomu. Jedná se o substituční mutace ($Phe_{270}$→Val) a ($Ala_{364}$→Thr). Důležitou oblastí na βI-tubulinu je rovněž tzv. leucinový klastr ($Leu_{215,\ 217,\ 228}$), který se podílí na interakcích se sousedními protofilamenty. Mutace v této oblasti mají vliv na longitudinální a laterální kontakty v rámci mikrotubulu

a mohou vést ke zvýšení dynamiky a tím překonání suprese vyvolané taxany (Gonzalez-Garay et al., 1999)

Bodové mutace v βI-tubulinu jsou tedy důležitým buněčným mechanismem vzniku rezistence k taxanům a některé z nich lze využít i v klinické praxi jako nádorové markery. Např. Monzo a kol. (1999) pozorovali u pacientů s plicním karcinomem spojitost mezi mutacemi v GTP-ND či vazebném místě pro taxany a horším průběhem onemocnění v důsledku rezistence k terapii.

### 3.1.3 Rezistence spojená s α-tubulinovou podjednotkou

Přestože taxany interagují s β-tubulinem, může být vznik rezistence také důsledkem mutací a změn exprese v α-tubulinu. Ke vzniku rezistence může v první řadě vést samotné zvýšení exprese αI-tubulinu. Snížení jeho exprese na transkripční úrovni opětovně vede k obnovení senzitivity buněk k taxanům (Han et al., 2007). Některé mutace v α-tubulinu jsou také spojeny se změnou dynamiky mikrotubulů či ovlivňují jejich interakce s regulačními proteiny a mohou vést k taxanové rezistenci (Cabral et al., 1981; Martello et al., 2003).

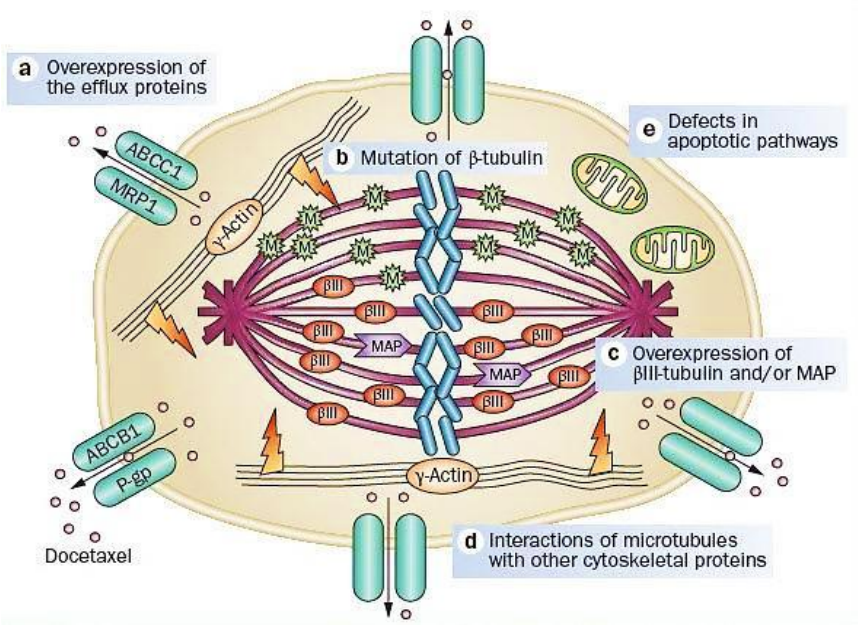
## 3.2 Rezistence k taxanům spojená s ABC přenašeči

Mnohočetná léková rezistence, kdy nádorové buňky vykazují rezistenci k cytostatikům lišícím se jak strukturně, tak i mechanismem účinku, je důsledkem exprese ATP-dependentních přenašečů. Tyto přenašeče patří do rodiny ABC přenašečů a mají specifitu k hydrofóbním látkám přírodní povahy jako jsou taxany, vincalkaloidy či antracykliny. ABC přenašeče čerpají tyto látky ven z buněk, čímž snižují jejich intracelulární koncentraci a vedou tak ke vzniku rezistence (shrnuto v Gottesman et al., 2002)

*In vitro* byla pozorována rezistence nádorových buněk k taxanům v důsledku zvýšené exprese genu ABCB1 kódujícím přenašeč MDR1 (multi-drug resistance-1) (Mechetner et al., 1998). Míra exprese tohoto přenašeče se i v klinické praxi ukázala být vhodným ukazatelem účinnosti terapie (Kamazawa et al., 2002). V MDR1 genu byl také objeven jednonukleotidový polymorfismus předurčující citlivost nádorových buněk k taxanům. Pacienti s wild type MDR1 mají nižší úspěšnost léčby než pacienti nesoucí homozygotní kombinaci alel se substituční mutací ve 21. exonu, která snižuje aktivitu

tohoto přenašeče (Green et al., 2006). Dalšími přenašeči vedoucími ke vzniku rezistence k taxanům jsou např. MDR3 (Duan et al., 2004), MRP7 (Hopper-Borge et al., 2004) či MRP2 (Huisman et al., 2005).

Funkci ABC přenašečů lze *in vitro* snadno blokovat přidáním inhibitorů, jako jsou verapamil či cyklosporin A. V klinické praxi se ale podání inhibitorů nesetkalo s významnějším úspěchem, neboť jsou tyto látky efektivní až v dávkách, které jsou pro člověka toxické (Seiden et al., 2002). Vhodným řešením do budoucna se zdá být inhibice exprese těchto přenašečů na transkripční úrovni pomocí malých interferujících RNA (siRNA), jejichž užití *in vitro* je velmi úspěšné (Duan et al., 2004).




**Obr. 2. Buněčné mechanismy rezistence k taxanům.** Mechanismy rezistence k taxanům mohou být výsledkem A) zvýšené exprese ABC přenašečů transportující taxany ven z buněk (např. ABCB1, MRP1), B) mutací v β-tubulinu vedoucí ke změně afinity vazby k taxanům či změně dynamiky mikrotubulů, C) změn v expresi β-tubulinových isotypů (zvýšení exprese βIII-tubulinu) vedoucí ke změně dynamiky mikrotubulů, D) změn ve schopnosti mikrotubulů interagovat s proteiny asociovanými s mikrotubuly a/nebo E) mutací či změn v expresi proteinů účastnících se apoptotických drah (převzato z Seruga et al., 2011).

# 4 Programovaná buněčná smrt v nádorových buňkách po aplikaci taxanů a související mechanismy rezistence

Programovaná buněčná smrt (PCD) je souhrn regulovaných procesů vedoucích k zániku buňky v důsledku ontogenetického programu či buněčného poškození. Aplikace taxanů vede k PCD, která může přecházet od apoptózy, která je procesem kontrolovaným na několika úrovních až k nekróze, která je procesem ryze pasivním. Pochopení mechanismů, kterými taxany indukují a realizují buněčnou smrt, může pomoci při vývoji účinnějších chemoterapeutik, případně při řešení problematiky spojené se vznikem rezistence k taxanům. V následujících kapitolách budou popsány proteiny účastnící se apoptózy v důsledku aplikace taxanů (p53, proteiny Bcl-2 rodiny, kaspázy) a současně budou diskutovány i další neapoptotické typy buněčné smrti.

## 4.1 p53 v apoptóze indukované taxany

Protein p53 je transkripční faktor, který se v buňkách aktivuje v odpověď na řadu stresových stimulů (poškození DNA, deprivace nukleotidů, hypoxie). Po aktivaci se p53 translokuje z cytosolu do buněčného jádra, kde indukuje expresi několika proteinů, např. proteinu p21, Bax (viz kapitola 4.2.2) a PIDD (viz kapitola 4.4.1.1). Tyto proteiny se účastní jednak inhibice progrese buněčného cyklu a v případě vážnějšího poškození indukují apoptózu (shrnuto v Levine et al., 1997). Funkcí p53 je tedy bránit nádorové transformaci a mutace v tomto proteinu jsou jedním z hlavních mechanismů, kterými si nádorové buňky zajišťují schopnost replikovat se nezávisle na buněčném poškození a uniknout apoptóze Vzhledem k tomu, že gen pro p53 je přibližně u 70% nádorových buněk mutován, jeví se často klasická chemoterapeutika, která poškozují DNA a indukují p53-dependentní apoptózu, jako neúčinná. Taxany, které indukují apoptózu poškozením mikrotubulárního systému a nezávisle na p53, se tak zdají být vhodnou alternativou léčby nádorů, které jsou ke klasické chemoterapii rezistentní.

V apoptóze indukované taxany dochází k zastavení buněčného cyklu během mitózy v důsledku inhibice funkce mitotického vřeténka a je pozorovatelná akumulace buněk v G2/M fázi. Znakem p53-dependentní apoptózy je oproti tomu zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, které je důsledkem genové exprese a aktivace proteinu p21 iniciované proteinem p53. Protein p21 funguje jako inhibitor komplexů cyklinů a cyklin-dependentních kináz regulujících progresi buněčného cyklu a současně inhibuje aktivitu

proliferačního antigenu buněčného jádra (PCNA), který indukuje přechod do S-fáze buněčného cyklu skrze aktivaci DNA-polymeráz (shrnuto v Levine et al., 1997).

V první řadě je nutné zmínit, že názory na důležitost p53 v apoptóze indukované taxany nejsou jednoznačné. Většina studií se sice shoduje na tom, že p53 se apoptózy indukovaná taxany neúčastní, jednak protože nebyla pozorována jeho aktivace u rezistentních ani u senzitivních buněk (Ehrlichová et al., 2005) a současně mutace či inhibice jeho exprese nijak signifikantně neovlivňují míru apoptózy (Reinecke et al., 2005).

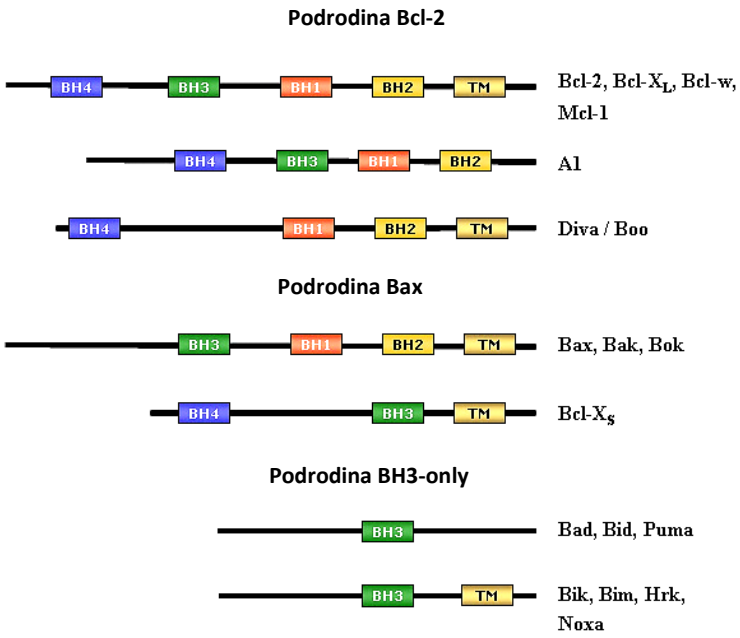
Některé studie však ukazují, že p53 alespoň částečně do apoptózy indukované taxany zasahuje, a to zejména při podání nízkých koncentrací taxanu. Nízké koncentrace taxanů totiž nejsou často dostačující pro úplnou inhibici funkce mitotického vřeténka. K zastavení v G2/M fázi a následné apoptóze dochází tak pouze u malé populace buněk, zatímco většina buněk může dále pokračovat v buněčném cyklu. Tyto buňky však v důsledku aberantní mitózy mají změněný počet molekul DNA či jiné poškození, které vede k aktivaci p53. Následná aktivace p21 vede k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a může docházet k indukci apoptózy (Tan et al., 2002). V souladu s tímto zjištěním jsou pozorování, kdy při použití nízkých koncentrací taxanu vedou mutace p53 k nádorové rezistenci, neboť u buněk nemůže v následujícím buněčném cyklu dojít k aktivaci p53-dependentní apoptózy (Liu et al., 2013).

Úloha p53 v apoptóze indukované taxany je tedy stále nejasná. Zdá se, že při podání běžných koncentrací taxanů nehraje p53 v apoptóze příliš důležitou roli. Zato při nízkých koncentracích, kdy se buňkám podaří uniknout cytotoxickému efektu taxanů je p53 zvláště důležitý, pro aktivaci p21 a případně i p53-dependentní apoptózy.

## 4.2 Proteiny Bcl-2 rodiny

Skupina proteinů Bcl-2 rodiny se účastní regulace iniciace vnitřní apoptotické dráhy. U savců bylo identifikováno minimálně 12 členů, které lze podle funkce rozdělit do dvou hlavních skupin. Bcl-2, Bcl-$X_L$ a Bcl-w patří do skupiny antiapoptotických členů. K proapoptotickým členům patří např. Bax, Bak, Bok, Bim, Bad či Bid. Tyto proteiny lze dále dělit podle počtu BH (Bcl-2 homologních) domén na multidoménové (Bcl-2, Bax, Bak) a na proteiny obsahující pouze BH3 doménu, tzv. BH3-only proteiny (Bim, Bad, Bik) (viz Obr. 3.). Kromě BH domén mají některé proteiny Bcl-2 rodiny na C-terminálním

konci hydrofobní úsek vytvářející helikální transmembránovou doménu (TM), která jim umožňuje interagovat s buněčnými membránami (shrnuto v Youle and Strasser, 2008).




**Obr. 3. Proteiny Bcl-2 rodiny** (Převzato z Roset et al. 2007)

Proteiny Bcl-2 rodiny tvoří prostřednictvím svých BH domén homodimery či heterodimery, čímž navzájem regulují svou aktivitu. Poměr proapoptotických a antiapoptotických členů Bcl-2 rodiny a typy interakcí mezi nimi rozhodují o indukci apoptózy a odpovědi buňky na apoptotický signál (shrnuto v Youle and Strasser, 2008).

### 4.2.1 Vliv taxanů na protein Bcl-2

V souvislosti s taxany je nejvíce prostudována úloha antiapoptotického Bcl-2 proteinu. Bcl-2 je lokalizován ve vnější membráně mitochondrií a endoplasmatického retikula, kde reguluje její integritu (více viz kapitoly 4.3 a 6). U nádorových buněk je často pozorována deregulace hladiny Bcl-2 proteinu, která ovlivňuje senzitivitu buněk k chemoterapii, ale jeho role je značně kontroverzní. U nádorových buněk rezistentních k taxanům bylo nejčastěji pozorováno zvýšení bazální hladiny Bcl-2 proteinu (Gazzit et al., 1998). Méně často pak i její snížení či úplná absence Bcl-2 proteinu (Ferlini et al., 2003), které jsou však spíše ojedinělými případy. Tato závislost citlivosti buněk na hladině Bcl-2 proteinu poukazuje na možnost jeho využití v klinické praxi jako nádorový marker determinující úspěšnost taxanové terapie (Yoshino et al., 2006).

Aktivita Bcl-2 proteinu je po aplikaci taxanů nejčastěji modulována na posttranslační úrovni skrze fosforylaci, která vede k inaktivaci jeho antiapoptotické funkce a ztrátě schopnosti chránit buňku před iniciací apoptózy (Haldar et al., 1996). V souvislosti s taxany byla pozorována fosforylace proteinu Bcl-2 kinázou Raf-1, která může být přímo stimulována taxany (Blagosklonny et al., 1996) a JNK (c-Jun-$NH_2$-terminální kináza) (Srivastava et al., 1999), která může být aktivována přes endoplasmatické retikulum, či v důsledku cytoskeletárního poškození. V poslední době se, ukazuje, že JNK vede k fosforylaci Bcl-2 v průběhu mitózy, kdy zvyšuje citlivost buněk k apoptotickým stimulům a jeho inaktivace tak nemusí být pouze důsledkem taxanové terapie, ale může se jednat o běžný fyziologický proces (Yamamoto et al., 1999). V souladu s výše popsaným mechanismem modulace aktivity Bcl-2 proteinu jsou zjištění, že mutace ve fosforylační doméně Bcl-2 a neschopnost buněk jej inaktivovat, mohou vést ke vzniku rezistence k taxanům (Srivastava et al., 1999).

Jiné studie naopak popisují fosforylaci Bcl-2 proteinu jako nezbytnou pro aktivaci jeho antiapoptotické funkce. Zatímco hladina nefosforylovaného Bcl-2 proteinu je v cytosolu udržována na nízké úrovni řízenou degradací v proteazomu, vede fosforylace Bcl-2 k inhibici jeho degradace, zvýšení cytosolické hladiny a možnosti uplatnit svůj antiapoptotický efekt. V tomto případě vedou mutace ve fosforylační doméně ke zvýšení citlivosti k taxanům, v důsledku neschopnosti aktivovat jeho antiapoptotickou funkci (Brichese et al., 2002; Ito et al., 199).

Studie Rodi a kol. (1999) vedla k objevení homologní oblasti na Bcl-2 proteinu s β-tubulinem, poukazujíc tak na možnost taxanů interagovat kromě mikrotubulů také přímo i s Bcl-2 proteinem a vést k jeho inaktivaci. Ferlini a kol. (2009) naznačují, že taxany napodobují aktivitu proteinu nur77, který reguluje buněčnou proliferaci a apoptózu a podobně jako taxany ovlivňuje aktivitu Bcl-2 proteinu a současně interaguje i s β-tubulinem. Přítomnost několika vazebných míst pro taxany v rámci buňky je důsledkem evoluční strategie rostlin, které za účelem překonání selekčního tlaku cíleně modulovaly a kombinovaly biologické aktivity svých molekul a mohly tak působit na více úrovních.

### 4.2.2 Vliv taxanů na další vybrané členy Bcl-2 rodiny

Bcl-$X_L$ je dalším antiapoptotickým členem Bcl-2 rodiny. Podobně jako u Bcl-2 je aplikace taxanů spojena s jeho fosforylací, která vede k inhibici jeho antiapoptotické funkce a indukci apoptózy. Jeho zvýšená exprese dokáže u nádorových buněk vést k taxanové rezistenci (Chun and Lee, 2004; Lebedeva et al., 2000)

Antiapoptotický efekt Bcl-2 a Bcl-$X_L$ spočívá v inhibici multidoménových proapoptotických členů Bcl-2 rodiny, např. proteinů Bax a Bak. Bax se nachází v cytosolu převážně jako monomer a jeho exprese může být iniciována proteinem p53. Aktivace Bax vede k jeho translokaci do mitochondrií, kde se prostřednictvím své TM domény stává integrálním membránovým proteinem. Protein Bak se primárně vyskytuje v mitochondriální membráně, kde interaguje s proteinem Bcl-$X_L$. Inaktivace Bcl-$X_L$ vede k jeho uvolnění a translokaci do cytosolu (shrnuto v Youle and Strasser, 2008). Indukce apoptózy je tedy částečně závislá na rozrušení Bcl-$X_L$/Bak interakcí a neschopnost buňky tyto interakce narušit může být příčinou taxanové rezistence (Flores et al., 2012).

Bax a Bak po své aktivaci vytváří mitochondriální póry, čímž vedou k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a uvolnění proapoptotických faktorů, které spouští vnitřní apoptotickou dráhu. Zejména důležitým se v apoptóze indukované taxany zdá být protein Bax, neboť snížení jeho exprese vede u mnoha pozorovaných buněk k vyvinutí rezistence (Schuyer et al., 2001), zatímco inhibice exprese proteinu Bak rezistenci k taxanům nezpůsobuje (Janssen, et al., 2007).

BH3-only proteiny jsou proapoptitickými členy Bcl-2 rodiny. Nacházejí se v různých buněčných kompartmentech, kde fungují jako primární senzory apoptotických signálů. Aktivované BH3-only proteiny primárně neutralizují antiapoptotické členy Bcl-2 rodiny a jejich prostřednictvím tak vedou k aktivaci multidoménových proapoptotických členů Bcl-2 rodiny (shrnuto v Youle and Strasser, 2008). Jedním z BH3-only proteinů aktivovaným v apoptóze indukované taxany je např. protein Bid, který se vyskytuje v cytosolu, kde může být štěpen iniciačními kaspázami-2 (Ho et al., 2008) či -8 (Huisman et al., 2002) na aktivní formu tBid (truncated Bid). Tento protein ale pravděpodobně nehraje v apoptóze indukované taxany příliš důležitou roli, neboť inhibice jeho exprese nedokáže způsobit rezistenci k taxanům (Janssen et al., 2007). Velmi důležitým proteinem se naopak zdá být protein Bim, který je za

normálních podmínek vázán na mikrotubulární dyneinový komplex a po aktivaci je uvolněn do cytosolu, kde moduluje aktivitu antiapoptotických členů, ale dokáže i přímo interagovat s proteiny Bax a Bak. Snížením či úplnou inhibicí genové exprese proteinu Bim lze indukovat rezistenci k taxanové terapii (Janssen et al., 2007)

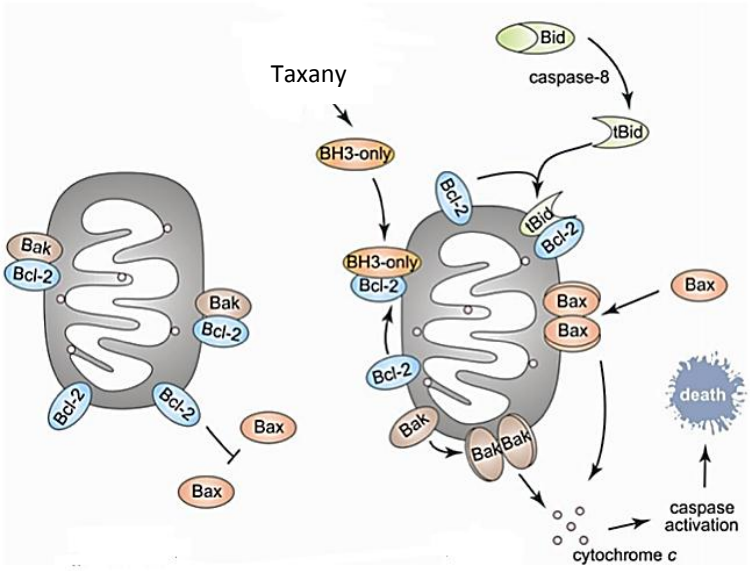
## 4.3 Taxany a jejich efekt na mitochondrie

Permeabilizace vnější mitochondriální membrány doprovázená poklesem membránového potenciálu a uvolněním propapoptotických molekul z intermembránového prostoru v důsledku aplikace taxanů, je klíčovou událostí v zahájení vnitřní apoptotické dráhy (André et al., 2002; Pan et al., 2001). K těmto proapoptotickým molekulám patří cytochrom c, SMAC/Diablo, AIF a endonukleáza G. Zatímco poslední dva zmíněné proteiny se translokují do jádra, kde se podílí na fragmentaci DNA, cytochrom c a SMAC/Diablo se přímo podílí na aktivaci efektorů apoptózy - kaspáz (viz kapitola 4.4.1.3).

Cytochrom c má v mitochondriích funkci elektronového přenašeče v respiračním řetězci, zatímco v cytosolu se váže na protein Apaf-1, dATP a prokaspázu-9, čímž se vytvoří heptamerický komplex zvaný apoptozom vedoucí k aktivaci kaspázy-9. V některých případech však k uvolnění cytochromu c po aplikaci taxanů nedochází vůbec (Kovar et al., 2009) nebo k němu dochází pouze u rezistentních buněčných linií (Ehrlichová et al., 2005). Poslední dvě zmíněné studie naznačují, že uvolnění cytochromu c v apoptóze indukované taxany není nezbytné a buněčná smrt se může realizovat jinými mechanismy než přes mitochondriální apoptotickou dráhu. Janssen a kol. (2007) také zjistili, že nádorové buňky deficientní na protein Apaf-1 jsou k taxanům rezistentní. Zvýšením jeho exprese lze však citlivost k taxanům opět obnovit (Perkins et al., 2000).

Regulace integrity mitochondriální membrány se primárně účastní proteiny Bcl-2 rodiny. Aplikace taxanů inhibuje funkci antiapoptotických členů a umožňuje proapoptotickým členům Bax a Bak oligomerizovat a vytvářet v mitochondriální membráně kanály (viz Obr. 4.). Další možností vedoucí k mitochondriální permeabilizaci je otevření mitochondriálních pórů (PTP), které je taktéž regulováno proteiny Bcl-2 rodiny, zejména samotným Bcl-2, který interaguje s napěťově ovládaným aniontovým kanálem (VDAC), který je jedním z proteinů tvořící PTP. Fosforylace Bcl-2 po aplikaci

taxanů vede ke změně konformace VDAC a tím i celého PTP a indukuje jeho otevření (Kidd et al., 2002). André a kol. (2002) popisují, že k uvolnění cytochromu c a dalších proapoptotických faktorů v důsledku aplikace taxanů dochází právě přes mitochondriální pór.




**Obr. 4. Úloha proteinů Bcl-2 rodiny v regulaci iniciace vnitřní apoptotické dráhy**. Za normálních podmínek je aktivita proapoptotických proteinů Bax a Bak inhibována antiapoptotickými členy Bcl-2 rodiny (vlevo). Po apoptotickém stimulu (vpravo) dochází nejprve k aktivaci BH3-only proteinů, které inaktivují antiapoptotické proteiny a umožňují tak oligomerizaci proteinů Bax a Bak a následnou tvorbu kanálů vedoucí k permeabilizaci mitochondriální membrány a uvolnění proapoptotických molekul (převzato a upraveno z Rautureau et al., 2010).

Nedávné studie vedly ke zjištění, že nedílnou součástí mitochondriální membrány je také β-tubulin, který je vázaný na VDAC. Působení taxanů tak nemusí vést k permeabilizaci mitochondriální membrány pouze nepřímo prostřednictvím proteinů Bcl-2 rodiny, ale může být stimulována i přímou interakcí taxanů s mitochondriálním β-tubulinem, který přes VDAC indukuje otevření PTP (Carre et al., 2002).

## 4.4 Aktivace kaspáz po aplikaci taxanů

Hlavní výkonnou složkou apoptózy je proteolytický systém zahrnující nejméně 10 členů rodiny cysteinových proteáz – kaspáz. Intracelulární kaspázy existují ve formě zymogenů (prokaspáz), které se aktivují proteolytickým štěpením. Aktivované kaspázy mohou následně aktivovat jiné kaspázy či štěpit specifické substráty, které vedou k charakteristickým znakům apoptózy jako je kondenzace chromatinu, fragmentace

DNA, zmenšování objemu buňky a její rozpad na apoptotická tělíska, které jsou *in vivo* fagocytovány buňkami imunitního systému. Kaspázy lze rozdělit do dvou hlavních tříd: iniciační kaspázy (-2, -8, -9 a -10) a efektorové, také známé jako exekutivní kaspázy (-3, -6 a -7) (shrnuto v Thornberry and Lazebnik, 1998).

### 4.4.1 Iniciační kaspázy aktivované taxany

#### 4.4.1.1 Kaspáza-2

Kaspáza-2 je evolučně nejvíce konzervovanou savčí kaspázou, jejíž přesná fyziologická funkce není dosud známá. Některé studie naznačují, že se jedná o apikální kaspázu, která se aktivuje v důsledku poškození cytoskeletu, např. působením taxanů a je hlavní iniciační kaspázou aktivující další iniciační a exekutivní kaspázy (Jelinek et al., 2013). Současně však může být aktivována až v pozdějších fázích apoptózy kaspázou-3 za účelem amplifikace apoptotického signálu (Li et al., 1997). Kaspáza-2 se přes štěpení propapoptotických proteinů Bax a Bid může napojit na mitochondriální apoptotickou dráhu (Ho et al., 2008) a štěpením proteinu Golgin-160 a spektrinu vést k desintegraci Golgiho aparátu a tvorbě apoptotických tělísek.

K aktivaci kaspázy-2 může docházet několika mechanismy. V souvislosti s taxanovou tarapií byla pozorována její aktivace v rámci proteinového komplexu známého jako PIDDosom, který je tvořený proteinem PIDD, RAIDD a prokaspázou-2 (Ho et al., 2008). Dále může být aktivována JNK kinázou v důsledku stresové reakce endoplasmatického retikula (Mhaidat et al., 2008). Existují však pravděpodobně i další mechanismy její aktivace (Jelinek et al., 2013).

Aktivace kaspázy-2 je v apoptóze indukované mechanismy častou událostí pozorovanou u řady buněčných linií často i odlišného původu. Dochází k ní u buněk hematopoetického původu (Wang et al., 2004) a u řady nádorů původem z epitelů, např. karcinomu prostaty (Luo et al., 2010) či prsu (Jelinek et al., 2013; Kovar et al., 2009). U karcinomu prostaty byly pro dopravu taxanu do buněk použity hydroxyapatitové partikule, které v porovnání s běžným způsobem podání vedly k výraznější aktivaci kaspázy-2 a vyšší míře apoptózy (Luo et al., 2010). Na její důležitou úlohu v souvislosti s taxanovou terapií však poukazují i další studie. Např. Mhaidat a kol. (2007) prokázali na buňkách melanomu, že aktivace kaspázy-2 je po aplikaci taxanů primární událostí a její činností pak dochází k permeabilizaci mitochondriální membrány a aktivaci vnitřní

apoptotické dráhy. Napojení na tuto dráhu bylo překvapivě nezávislé na proteinu Bid, ale závislé na proteinu Bax, jehož aktivaci kaspáza-2 stimulovala. Současně bylo prokázáno, že inhibicí aktivity kaspázy-2 dochází k výraznému poklesu míry apoptózy a buňky se stávají k taxanům alespoň částečně rezistentní (Ho et al., 2008).

#### 4.4.1.2 Kaspáza-8 a -10

Iniciační kaspázy-8 a -10 jsou spojené s indukcí vnější apoptotické dráhy a jsou aktivovány přes tzv. receptory smrti umístěné v cytoplasmatické membráně. Jedním z důležitých receptorů je např. FAS receptor, který má na cytoplasmatické straně konzervovanou sekvenci známou jako doména smrti. Po stimulaci receptoru apoptotickým signálem (Fas ligandem) se na tuto doménu naváže protein FADD (FAS associated death domain), prokaspázy-8 či -10 a dochází k jejich aktivaci (shrnuto v Thornberry and Lazebnik, 1998).

Taxany jakožto vysoce hydrofobní látky se do buněk dostávají prostou difúzí a nebyla u nich prokázána indukce apoptózy před receptory smrti. Přesto taxay do vnější apoptotické dráhy mohou zasahovat a to buď za účelem amplifikace apoptotického signálu např. přes aktivaci kaspázy-3, která aktivuje kaspázu-8 (Wieder et al., 2001) nebo přímou stimulací proteinu FADD. Tento typ aktivace přes FADD byl v souvislosti s taxany pozorován u kaspázy-10 (Park et al., 2004). Další způsob aktivace kaspázy-8 po aplikaci taxanů pozorovali Mielgo a kol. (2009). Kaspáza-8 nese na svém N-terminálním konci dvě efektorové domény smrti (DED), které jsou homologní k proteinu FADD a přes které dochází k jejich interakci. Podobná homologní oblast byla objevena i na mikrotubulech, což poukazuje na možnost aktivace kaspázy-8 přes interakci přímo s mikrotubuly. Výše zmíněná studie objevila, že mutace $Lys_{156}$ ve DED doméně kaspázy-8 vede k oslabení schopnosti kaspázy-8 interagovat s mikrotubuly a inhibici její aktivace, což vy výsledku vede částečné taxanové rezistenci.

Aktivace kaspázy-8 byla po podání taxanů pozorována např. u karcinomu prsu (Jelinek et al., 2013; Kovar et al., 2009, B-lymfomu (Wang et al., 2004), karcinomu štítné žlázy (Pan et al., 2001), karcinomu plic (Oyaizu et al., 1999) a její aktivace následně vedla ke štěpení proteinu Bid a tím indukci vnitřní apoptotické dráhy.

Aktivace kaspázy-10 není obecně v apoptóze indukované taxany pozorovaná tak často jako aktivace kaspázy-8 a její úloha v apopóze tedy zřejmě není tak důležitá.

Některé studie navíc dokazují, že taxany indukovaná apoptóza je na kaspáze-10 úplně nezávislá (Janssen et al., 2007). Proto je poněkud překvapující studie Park a kol. (2004), kdy podání taxanů vede u leukemických buněk primárně k aktivaci kaspázy-10, která následně aktivuje kaspázu-8 a další exekutivní kaspázy, nezávisle však na uvolnění cytochromu c. Inhibice kaspázy-10 vede k výraznému poklesu celé apoptotické kaskády. Tato studie tedy naznačuje, že přinejmenším u některých buněčných linií může mít kaspáza-10 rozhodující úlohu v indukci apoptotické kaskády a současně může přímo aktivovat exekutivní kaspázy.

#### 4.4.1.3 Kaspáza-9

Vnitřní apoptotická dráha je primárně spojena s aktivací iniciační kaspázy-9, která následně aktivuje kaspázy efektorové. K její aktivaci po aplikaci taxanů dochází nejčastěji přes multimerní proteinový komplex apoptozom (viz kapitola 4.3) a byla pozorována u řady buněčných linií, např. u leukemických buněk (Perkins et al., 2000), u karcinomu prsu (Jelinek et al., 2013) či karcinomu štítné žlázy (Pan et al., 2001). Kaspáza-9 však může být v taxany indukované apoptóze aktivovaná i kaspázou-4 přes endoplasmatické retikulum a být tak nezávislá na uvolnění cytochromu c a tvorbě apoptozomu (viz kapitola 6).

V souvislosti s taxany bylo pozorováno, že aktivita kaspázy-9 může být regulovaná proteinem SMAC/Diablo, který se společně s cytochromem c uvolňuje z mitochondrií (McNeish et al., 2002). Tento protein vede k neutralizaci proteinů z rodiny inhibitorů apoptózy (IAP), které inhibují aktivitu kaspáz. K těmto proteinům patří např. survivin či XIAP (X-linked IAP), který interaguje s kaspázami-9, -3 a -7. Protein survivin neinteraguje s kaspázami přímo, ale může inhibovat aktivitu SMAC/Diablo nebo vytvářet komplex s proteinem XIAP a zvýšit tak jeho schopnost vázat kaspázy a inhibovat jejich aktivitu (Song et al., 2003). V souvislosti se survivnem bylo zjištěno, že zvýšení jeho exprese může vést k taxanové rezistenci (Zaffaroni et al., 2002).

Kaspáza-9 by teoreticky měla mít v apoptóze indukované taxany primární roli, protože taxany nepůsobí na receptory smrti, ale spouští vnitřní dráhu apoptózy. Překvapivá jsou tedy zjištění, že k apotóze po aplikaci taxanů dochází i u buněčných linií, kde se kaspáza-9 neaktivuje (Ofir et al., 2002) a je tedy vidět, že taxany dokáží vést

k buněčné smrti i jinými mechanismy, např. nekrózou či přes endoplasmatické retikulum (viz kapitoly 5 a 6).

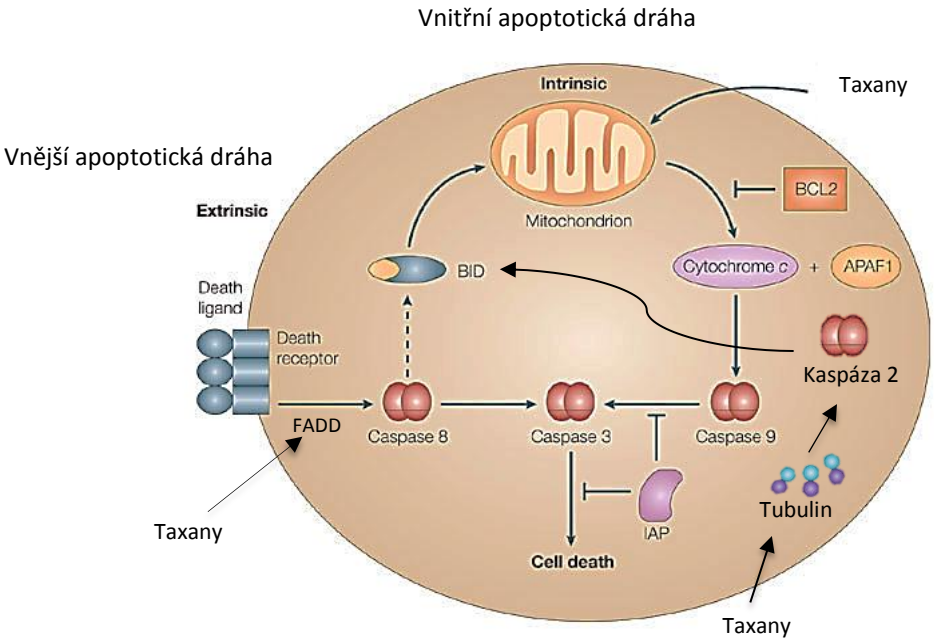
### 4.4.2 Exekutivní kaspázy-3, -6 a -7 aktivované taxany

Činností exekutivních kaspáz dochází k progresi apoptózy a objevení charakteristických apoptotických znaků. Kaspáza-3 a -7 mají podobnou substrátovou specifitu a výsledkem jejich štěpení dochází např. ke snížení reparační schopnosti buňky, fragmentaci DNA a tvorbě apoptotických tělísek. Substrátem kaspázy-6 jsou jaderné laminy, které po naštěpení vedou k rozpadu jaderného obalu a kondenzaci chromatinu. Hlavní a nejčastěji aktivovanou exekutivní kaspázou je kaspáza-3. K její aktivaci dochází nejčastěji přes mitochondriální apoptotickou dráhu aktivací kaspázou-9, ale může být aktivována i např. kaspázou-8 (shrnuto v Thornberry and Lazebnik, 1998).

Aktivace kaspázy-3 je častým jevem i v apoptóze indukované taxany. Její aktivace kaspázou-9 byla pozorována např. u osteosarkomu (Lu et al., 2005a), leukemických buněk (Lu et al., 2005b), plicního karcinomu (Wiegel et al., 2000). U plicního karcinomu byla pozorována její aktivace kaspázou-8 (Oyaizu et al., 1999).

Na význam kaspázy-3 v realizaci apoptózy po aplikaci taxanů ukazují i další studie. Poměrně častým jevem u nádorových buněk je konstitutivní aktivace či amplifikace některého z receptorů účastnících se regulace proliferace, např. HER2/neu či Src, která je spojena se vznikem rezistence k taxanům a tím pádem s horším průběhem nádorového onemocnění. Inhibice těchto receptorů však vede k obnovení senzitivity nádorových buněk k taxanům právě přes zvýšenou aktivaci kaspázy-3 (Ueno et al., 2000; Chen et al., 2005).

Kaspáza-3 vede k aktivaci kaspázy-6 a -7, které mají v taxany indukované apoptóze spíše vedlejší úlohu. Aktivace kaspázy-7 byla pozorována např. u karcinomu děložního čípku (Tai et al., 2013), prsu (Jelinek et al., 20013) a neuroblastomu (Rigamonti et al., 2000). K aktivaci kaspázy-6 docházelo např. u leukemických buněk (Park et al., 2004) a retinoblastomu (D'Anneo et al., 2010).




**Obr. 5. Taxany indukovaná aktivace kaspáz.** Taxany primárně indukují spuštění vnitřní mitochondriální dráhy, kdy nejprve dochází k uvolnění cytochromu c, který spolu s Apaf-1 aktivuje kaspázu-9. Kaspáza-9 následně aktivuje exekutivní kaspázu-3, která vede k progresi apoptózy. Aktivita kaspáz-9 a -3 může být regulovaná proteiny z rodiny IAPs. Taxany rovněž mohou aktivovat přes protein FADD kaspázu-8, která přes protein Bid vede k aktivaci vnitřní apoptotické dráhy nebo může přímo aktivovat kaspázu-3. Bid může být také aktivován kaspázou-2, která může být aktivována taxany v důsledku cytoskeletárního poškození (převzato a upraveno z Andersen et al., 2005).

# 5 Neapoptotické mechanismy buněčné smrti indukované taxany

Apoptóza a apoptóze podobné mechanismy buněčné smrti jsou bezesporu nejdůležitější a nejlépe popsané dráhy vedoucí k eliminaci nádorových buněk po aplikaci taxanů. Taxany však v závislosti na koncentraci, která je buňkám aplikována a genetickém pozadí nádorových buněk mohou indukovat i další alternativní mechanismy buněčné smrti. Výsledný mechanismus buněčné smrti navíc nemusí být striktně jednoho typu a jednotlivé dráhy buněčné smrti se mohou různě doplňovat. Dva z těchto alternativních mechanismů buněčné smrti (nekróza a mitotická katastrofa) pozorované po aplikaci taxanů budou popsány dále.

## 5.1 Nekróza

Na rozdíl od přísně regulovaného mechanismu apoptózy je nekróza více chaotickým a na kaspázách nezávislým způsobem buněčné smrti. Nekrotickou smrt lze rozdělit do dvou typů. Klasická nekróza je důsledkem náhlého a nevratného poškození

buňky např. působením vysoké teploty, detergentů či toxických látek. Jako programovaná nekróza je označován mechanismus buněčné smrti, kdy byl prvotně spuštěn apoptotický program, následně zastavený na úrovni aktivace kaspáz a dokončen na kaspázách nezávislým mechanismem. U obou typů nekrózy dochází v konečné fázi k prasknutí cytoplasmatické membrány a uvolnění buněčného obsahu do extracelulárního prostoru, kde způsobuje zánětlivou reakci (shrnuto v Leist and Jaattela, 2001).

Nekrotická smrt po aplikaci taxanů byla pozorována v závislosti na jejich koncentraci a na fázi buněčného cyklu, ve které byly taxany buňkám aplikovány. Mailloux a kol. (2001) pozorovali, že při podání vysokých (mikromolárních) koncentrací taxanu docházelo k nekróze, zatímco podání nižších (nanomolárních) koncentrací vedlo k apoptotickému způsobu smrti. Příčina je pravděpodobně taková, že vysoké koncentrace taxanů vedou k okamžité stabilizaci mikrotubulárního systému a tím inhibici všech jeho funkcí, zatímco nízké koncentrace nemají tak výrazný efekt a jejich účinek se projeví spíše až během buněčného dělení.

K indukci nekrózy také poměrně překvapivě vedlo přidání taxanů během G2 fáze buněčného cyklu, i když jejich aplikace v G1 a S fázi indukovala apoptózu. Liao and Lieu, (2005) se domnívají, že podání taxanů během G2 fáze vede k mitochondriálnímu poškození dříve, než můžou být uvolněny proapoptotické faktory, v důsledku čehož dochází spíše k nekróze než k apoptóze.

Ani jeden z autorů však blíže nespecifikuje, o jaký typ nekrózy se jedná. Je pravděpodobné, že při aplikaci vysokých koncentrací taxanů dochází spíše ke klasické nekróze, zatímco nekróza vyskytující se při aplikaci taxanů během G2/M fáze je poměrně atypická a je tedy možné, že se jedná spíše o tzv. programovanou nekrózu. Otázka výhody nekrotické smrti v klinické praxi je sporná. Na jednu stranu může lokální zánět stimulovat buňky imunitního systému k likvidaci nádoru. Na stranu druhou může rozsáhlejší zánětlivá reakce vést systémové toxicitě.

## 5.2 Mitotická katastrofa

Termín mitotická katastrofa označuje buněčnou smrt, při které dochází k destrukci buňky v průběhu mitózy nebo krátce po ní. Často je důsledkem aberantní segregace chromozomů a je pro ni charakteristická přítomnost dekondenzovaných chromozomů, multinukleace (přítomnost většího počtu jader v důsledku nepřesné cytokineze) a

mikronukleace (v důsledku vytvoření jaderného obalu kolem jednotlivých chromozomů) (shrnuto v Castedo et al., 2004).

Z výše uvedeného popisu mitotické katastrofy se zdá, že taxany, které ovlivňují činnost mitotického vřeténka a brání tak dokončení mitózy, by mohly indukovat buněčnou smrt právě přes mitotickou katastrofu. Tento typ buněčné smrti ale není v souvislosti s taxany příliš běžný a je spíše pozorován při podání nízkých koncentrací taxanu. Vysvětlení je takové, že mitotická katastrofa se přednostně vyskytuje u buněk, které nejsou schopny zastavit buněčný cyklus v G2/M fázi, např. v důsledku mutací v kinázách, které G2/M blok regulují (Castedo et al., 2002). Taxany indukovaná mitotická katastrofa se tedy u většiny buněk nevyskytuje, protože tyto buňky jsou schopny G2/M blok indukovat.

Vzhledem to mu, že mitotická katastrofa a apoptóza mají několik společných znaků (permeabilizace mitochondriální membrány, aktivace kaspáz, zejména -2 a -9), je poměrně těžké od sebe jednotlivé dráhy oddělit a je také běžné, že mitotická katastrofa vyústí v apoptózu. V souvislosti s taxanovou terapií byla mitotická katastrofa hlavním mechanismem buněčné smrti u buněk plicního karcinomu deficientních na Bcl-2 protein a se sníženou expresí kaspázy-3 (Morse et al., 2005). Ve většině případů, např. u karcinomu prsu (Blajeski et al., 2001), plic (Torres and Horwitz, 1998) a prostaty (Fabbri et al., 2008) byla mitotická katastrofa doprovázena apoptózou a byla pozorována aktivace kaspázy-2 a -3.

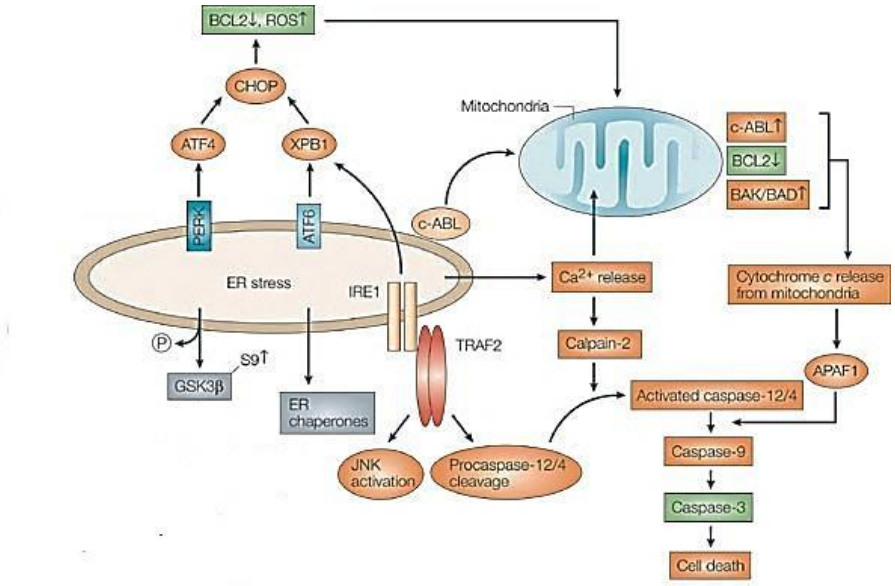
# 6 Taxany a endoplasmatické retikulum

Endoplasmatické retikulum (ER) je místem proteosyntézy, sbalování proteinů a kromě mitochondrií je další buněčnou organelou, která může iniciovat apoptózu. Apoptotické stimuly zpomalují funkce ER, dochází k akumulaci nesbalených proteinů a aktivaci buněčné odpovědi UPR (unfolded protein response). Tato odpověď zahrnuje aktivaci tří signálních drah, jejichž prvními členy jsou transmembránové receptory PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase), ATF6 (activating transcription factor 6) a IRE1 (inositol-requiring enzyme 1). Tyto signální dráhy vedou k aktivaci proteinů realizujících UPR, např. molekulárních chaperonů, ATF4 (activating transcription factor 4), JNK či transkripčního faktoru iniciujícího apoptózu CHOP (CCAAT/-enhancer-binding

protein homologous protein). Cílem UPR je snížit hladinu nesbalených proteinů a obnovit normální funkci ER. Pokud stresové stimuly přetrvávají, indukuje ER apoptózu prostřednictvím uvolnění Ca2+ do cytosolu (shrnuto v Szegedi et al., 2006).

Pro udržování nízké cytosolické hladiny $Ca^{2+}$ je důležitá rovnováha mezi aktivním transportem $Ca^{2+}$ do ER prostřednictvím SERCA pumpy a pasivním uvolňování přes inositol-1,4,5-trisfosfát receptor (IP3R). Bylo zjištěno, že taxany dokáží stimulovat uvolnění $Ca^{2+}$ prostřednictvím IP3R a to hned několika mechanismy. Podobně jako PTP v mitochondriích je aktivita IP3R inhibována antiapoptotickým Bcl-2 proteinem (Zong et al., 2003) a jeho fosforylace indukovaná taxany inhibující jeho funkci tak umožňuje uvolnění $Ca^{2+}$ z ER (Bassik et al., 2004). Uvolnění $Ca^{2+}$ ale může probíhat i jinými mechanismy, neboť k němu dochází i u Bcl-2 deficientních buněk (Pan and Gollahon, 2001). Např. byl objeven další vazebný protein pro taxany - NCS1 (neuronal $Ca^{2+}$ sensor 1), který je součástí IP3R a vazba taxanů by mohla přímo stimulovat uvolnění $Ca^{2+}$ (Boehmerle et al., 2006). Uvolnění $Ca^{2+}$ nemusí mít roli pouze na počátku apoptotické kaskády, jeho uvolnění v pozdějších fázích apoptózy je spojeno s amplifikací apoptotického signálu. Stimulace IP3R k uvolňování $Ca^{2+}$ v této pozdější fázi apoptózy může být realizována cytochromem c či kaspázou-3 (Boehning et al., 2003).

Kinetika uvolňování $Ca^{2+}$ z ER a jak moc bude ER do apoptózy zasahovat závisí na aplikované koncentraci taxanů. Nízké koncentrace taxanů hladinu cytosolického $Ca^{2+}$ příliš neovlivňují a k apoptóze dochází $Ca^{2+}$-nezávislým mechanismem. Oproti tomu vysoké koncentrace taxanů mají na ER přímý efekt, dochází k rychlému nárůstu cytosolické hladiny $Ca^{2+}$ a dochází k $Ca^{2+}$-dependentní apoptóze (Pan and Gollahon, 2013). Cytosolické $Ca^{2+}$ je opětovně přijato mitochondriemi, kde vede ke snížení membránového potenciálu a dochází k uvolnění proapoptotických molekul. $Ca^{2+}$ také mohou přímo vést k aktivaci $Ca^{2+}$-dependentních enzymů, např. calpainu či kaspázy-4, které vedou k aktivaci kaspázy-9 a calpain může současně štěpit i protein Bid (Liao et al., 2008) (viz Obr. 6).




**Obr. 6. Napojení apoptotických signálů ER na mitochondriální dráhu.** Stresové stimuly vedou u ER ke spuštění UPR, která vede k aktivaci trasmembránových receptorů (PERK, ATF6, IRE1). Spuštěním těchto signálních drah dochází k translaci chaperonů, aktivaci JNK a proteinu CHOP, který reguluje aktivitu proteinů Bcl-2 rodiny a tím i integritu mitochondriální membrány. Uvolnění $Ca^{2+}$ z ER vede k aktivaci kaspázy-4 a calpainu, které následně mohou aktvivovat kaspázu-9 (převzato a upraveno z Ma and Hendershot, 2004).

# 7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout dosavadní poznatky o indukci a průběhu programované buněčné smrti po aplikaci taxanů. I přesto, že jsou taxany známé přibližně od poloviny 20. století a jsou předmětem výzkumu mnoha vědeckých skupin, víme o mechanismech, kterými vedou k eliminaci nádorových buněk překvapivě stále velmi málo a výsledky jsou často kontroverzní. Tyto rozpory vyplývají jednak z odlišného genetického pozadí jednotlivých nádorových linií, ale mohou být také způsobeny užitím různých taxanových léků (paclitaxel, docetaxel, deriváty taxanů).

Je známo, že taxany indukují buněčnou smrt přes stabilizaci mikrotubulů, která vede k zastavení buněčného cyklu a následné apoptóze. V regulaci iniciace apoptózy hrají důležitou úlohu zejména proteiny Bcl-2 rodiny, které regulují integritu membrány mitochondrií a endoplasmatického retikula a jejich aktivita může být přímo či nepřímo modulována taxany. Vlastní průběh apoptózy pak realizují kaspázy, kde se zvlášť důležitou jeví kaspáza-2, která se aktivuje v důsledku cytoskeletárního poškození. Sporná je úloha proteinu p53. Přesto, že se obecně věří, že apoptóza indukovaná taxany

je na p53 nezávislá, některé studie dokazují, že zejména při podání nízkých koncentrací taxanu je jeho role důležitá a mutace v p53 mohou vést k nádorové rezistenci.

Objasnění mechanismů, kterými taxany indukují a vedou k buněčné smrti, může pomoci při vývoji účinnějších chemoterapeutik, případně při řešení problematiky spojené se vznikem rezistence k taxanům. Vhodnou kombinací taxanů s dalšími cytostatiky či chemoterapeutickými postupy může docházet ke zvýšení efektivity nádorové terapie. Například je známo, že taxany zvyšují účinnost radioterapie, neboť u nádorových buněk vedou k zastavení G2/M fázi, ve které jsou buňky nejvíce radiosenzitivní. Problematikou taxanů bych se ráda zabývala i během svého magisterského studia.

# 8 Seznam literatury


ANDERSEN, M. H., J. C. BECKER AND P. T. STRATEN Regulators of apoptosis: Suitable targets for immune therapy of cancer. Nature Reviews Drug Discovery, May 2005, 4(5), 399-409.

ANDRE, N., M. CARRE, G. BRASSEUR, B. POURROY, et al. Paclitaxel targets mitochondria upstream of caspase activation in intact human neuroblastoma cells. Febs Letters, Dec 2002, 532(1-2), 256-260.

ANDREU, J. M., J. F. DIAZ, R. GIL, J. M. DEPEREDA, et al. Solution structure of taxotere-induced microtubules to 3-nm resolution – the change in protofilament number is linked to the binding of the taxol side-chain. Journal of Biological Chemistry, Dec 1994, 269(50), 31785-31792.

ARNAL, I. AND R. H. WADE How does taxol stabilize microtubules. Current Biology, Aug 1995, 5(8), 900-908.

BASSIK, M. C., L. SCORRANO, S. A. OAKES, T. POZZAN, et al. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca2+ homeostasis and apoptosis. Embo Journal, Mar 2004, 23(5), 1207-1216.

BLADE, K., D. R. MENICK AND F. CABRAL Overexpression of class I, II or IVb beta-tubulin isotypes in CHO cells is insufficient to confer resistance to paclitaxel. Journal of Cell Science, Jul 1999, 112(13), 2213-2221.

BLAGOSKLONNY, M. V., T. SCHULTE, P. NGUYEN, J. TREPEL, et al. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. Cancer Research, Apr 1996, 56(8), 1851-1854.

BLAJESKI, A. L., T. J. KOTTKE AND S. H. KAUFMANN A multistep model for paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer cell lines. Experimental Cell Research, Nov 2001, 270(2), 277-288.

BRICHESE, L., N. BARBOULE, C. HELIEZ AND A. VALETTE Bcl-2 phosphorylation and proteasome-dependent degradation induced by paclitaxel treatment: Consequences on sensitivity of isolated mitochondria to bid. Experimental Cell Research, Aug 2002, 278(1), 101-111.

BOEHMERLE, W., U. SPLITTGERBER, M. B. LAZARUS, K. M. MCKENZIE, et al. Paclitaxel induces calcium oscillations via an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and neuronal calcium sensor 1-dependent mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Nov 2006, 103(48), 18356-18361.

BOEHNING, D., R. L. PATTERSON, L. SEDAGHAT, N. O. GLEBOVA, et al. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. Nature Cell Biology, Dec 2003, 5(12), 1051-1061.

CABRAL, F., I. ABRAHAM AND M. M. GOTTESMAN Isolation of a taxol-resistant chinese-hamster ovary cell mutant that has an alteration in a-tubulin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 1981, 78(7), 4388-4391.

CARRE, M., N. ANDRE, G. CARLES, H. BORGHI, et al. Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel. Journal of Biological Chemistry, Sep 2002, 277(37), 33664-33669.

CASTEDO, M., J. L. PERFETTINI, T. ROUMIE, K. ANDREAU, et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. Oncogene, Apr 2004, 23(16), 2825-2837.

CASTEDO, M., J. L. PERFETTINI, T. ROUMIER AND G. KROEMER Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. Cell Death and Differentiation, Dec 2002, 9(12), 1287-1293.

CHEN, T., Y. PENGETNZE AND C. C. TAYLOR Src inhibition enhances paclitaxel cytotoxicity in ovarian cancer cells by caspase-9-independent activation of caspase-3. Molecular Cancer Therapeutics, Feb 2005, 4(2), 217-224.

CHUN, E. Y. AND K. Y. LEE Bcl-2 and Bcl-x(L) are important for the induction of paclitaxel resistance in human hepatocellular carcinoma cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, Mar 2004, 315(3), 771-779.

D'ANNEO, A., G. AUGELLO, A. SANTULLI, M. GIULIANO, et al. Paclitaxel and Beta-Lapachone Synergistically Induce Apoptosis in Human Retinoblastoma Y79 Cells by Downregulating the Levels of Phospho-Akt. Journal of Cellular Physiology, Feb 2010, 222(2), 433-443.

DERRY, W. B., L. WILSON, I. A. KHAN, R. F. LUDUENA, et al. Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes. Biochemistry, Mar 1997, 36(12), 3554-3562.

DIAZ, J. F. AND J. M. ANDREU Assembly of purified GDT tubulin into microtubules induced by taxol and taxoltre – reversibility. Ligand stoichiometry, and competition. Biochemistry, Mar 1993, 32(11), 2747-2755.7

DOWNING, K. H. AND E. NOGALES Tubulin and microtubule structure. Current Opinion in Cell Biology, Feb 1998, 10(1), 16-22.

DUAN, Z. F., K. A. BRAKORA AND M. V. SEIDEN Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. Molecular Cancer Therapeutics, Jul 2004, 3(7), 833-838.

DUMONTET, C., G. E. DURAN, K. A. STEGER, L. BEKETICORESKOVIC, et al. Resistance mechanisms in human sarcoma mutants derived by single-step exposure to paclitaxel (Taxol). Cancer Research, Mar 1996, 56(5), 1091-1097.

EHRLICHOVA, M., M. KOC, J. TRUKSA, Z. NALDOVA, et al. Cell death induced by taxanes in breast cancer cells: Cytochrome c is released in resistant but not in sensitive cells. Anticancer Research, Nov-Dec 2005, 25(6B), 4215-4224.

ELIE-CAILLE, C., F. SEVERIN, J. HELENIUS, J. HOWARD, et al. Straight GDP-tubulin protofilaments form in the presence of taxol. Current Biology, Oct 2007, 17(20), 1765-1770.

FABBRI, F., D. AMADORI, S. CARLONI, G. BRIGLIADORI, et al. Mitotic catastrophe and apoptosis induced by Docetaxel in hormone-refractory prostate cancer cells. Journal of Cellular Physiology, Nov 2008, 217(2), 494-501.

FERLINI, C., L. CICCHILLITTI, G. RASPAGLIO, S. BARTOLLINO, et al. Paclitaxel Directly Binds to Bcl-2 and Functionally Mimics Activity of Nur77. Cancer Research, Sep 2009, 69(17), 6906-6914.

FERLINI, C., G. RASPAGLIO, S. MOZZETTI, M. DISTEFANO, et al. Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance. Molecular Pharmacology, Jul 2003, 64(1), 51-58.

FLORES, M. L., C. CASTILLA, R. AVILA, M. RUIZ-BORREGO, et al. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells requires efficient mitotic arrest and disruption of Bcl-xL/Bak interaction. Breast Cancer Research and Treatment, Jun 2012, 133(3), 917-928.

GALMARINI, C. M., I. TREILLEUX, F. CARDOSO, C. BERNARD-MARTY, et al. Class III beta-tubulin isotype predicts response in advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or docetaxel. Clinical Cancer Research, Jul 2008, 14(14), 4511-4516.

GAZITT, Y., M. L. ROTHENBERG, S. G. HILSENBECK, V. FEY, et al. Bcl-2 overexpression is associated with resistance to paclitaxel, but not gemcitabine, in multiple myeloma cells. International Journal of Oncology, Oct 1998, 13(4), 839-848.(Haldar et al. 1996)

GIANNAKAKOU, P., D. L. SACKETT, Y. K. KANG, Z. R. ZHAN, et al. Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. Journal of Biological Chemistry, Jul 1997, 272(27), 17118-17125.

GONCALVES, A., D. BRAGUER, K. KAMATH, L. MARTELLO, et al. Resistance to Taxol in lung cancer cells associated with increased microtubule dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Sep 2001, 98(20), 11737-11742.

GONZALEZ-GARAY, M. L., L. CHANG, K. BLADE, D. R. MENICK, et al. A beta-tubulin leucine cluster involved in microtubule assembly and paclitaxel resistance. Journal of Biological Chemistry, Aug 1999, 274(34), 23875-23882.

GOTTESMAN, M. M., T. FOJO AND S. E. BATES Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. Nature Reviews Cancer, Jan 2002, 2(1), 48-58.

GREEN, H., P. SODERKVIST, P. ROSENBERG, G. HORVATH, et al. mdr-1 single nucleotide polymorphisms in ovarian cancer tissue: G2677T/A correlates with response to paclitaxel chemotherapy. Clinical Cancer Research, Feb 2006, 12(3), 854-859.

HALDAR, S., J. CHINTAPALLI AND C. M. CROCE Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. Cancer Research, Mar 1996, 56(6), 1253-1255.

HAN, E. K. H., L. GEHRKE, S. K. TAHIR, R. B. CREDO, et al. Modulation of drug resistance by alpha-tubulin in paclitaxel-resistant human lung cancer cell lines (vol 36, pg 1565, 2000). European Journal of Cancer, Apr 2007, 43(6), 1108-1108.

HARI, M., F. LOGANZO, T. ANNABLE, X. Z. TAN, et al. Paclitaxel-resistant cells have a mutation in the paclitaxel-binding region of beta-tubulin (AsP(26)Glu) and less stable microtubules. Molecular Cancer Therapeutics, Feb 2006, 5(2), 270-278.

HO, L. H., S. H. READ, L. DORSTYN, L. LAMBRUSCO, et al. Caspase-2 is required for cell death induced by cytoskeletal disruption. Oncogene, May 2008, 27(24), 3393-3404.

HOPPER-BORGE, E., Z. S. CHEN, I. SHCHAVELEVA, M. G. BELINSKY, et al. Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): Resistance to docetaxel. Cancer Research, Jul 2004, 64(14), 4927-4930.

HUISMAN, C., C. G. FERREIRA, L. E. BROKER, J. A. RODRIGUEZ, et al. Paclitaxel triggers cell death primarily via caspase-independent routes in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. Clinical Cancer Research, Feb 2002, 8(2), 596-606.

HUISMAN, M. T., A. A. CHHATTA, O. VAN TELLINGEN, J. H. BEIJNEN, et al. MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid. International Journal of Cancer, Sep 2005, 116(5), 824-829.

ITO, T., X. M. DENG, B. CARR AND W. S. MAY Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. Journal of Biological Chemistry, May 1997, 272(18), 11671-11673.

JANSSEN, K., S. POHLMANN, R. U. JANICKE, K. SCHULZE-OSTHOFF, et al. Apaf-1 and caspase-9 deficiency prevents apoptosis in a Bax-controlled pathway and promotes clonogenic survival during paclitaxel treatment. Blood, Nov 2007, 110(10), 3662-3672.

JELINEK, M., K. BALUSIKOVA, D. KOPPEROVA, V. NEMCOVA-FURSTOVA, et al. Caspase-2 is involved in cell death induction by taxanes in breast cancer cells. Cancer Cell International, May 2013, 13, 15.

KAMATH, K., L. WILSON, F. CABRAL AND M. A. JORDAN beta III-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability. Journal of Biological Chemistry, Apr 2005, 280(13), 12902-12907.

KAMAZAWA, S., J. KIGAWA, Y. KANAMORI, H. ITAMOCHI, et al. Multidrug resistance gene-1 is a useful predictor of paclitaxel-based chemotherapy for patients with ovarian cancer. Gynecologic Oncology, Aug 2002, 86(2), 171-176.

KAVALLARIS, M., D. Y. S. KUO, C. A. BURKHART, D. L. REGL, et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. Journal of Clinical Investigation, Sep 1997, 100(5), 1282-1293.

KIDD, J. F., M. F. PILKINGTON, M. J. SCHELL, K. E. FOGARTY, et al. Paclitaxel affects cytosolic calcium signals by opening the mitochondrial permeability transition pore. Journal of Biological Chemistry, Feb 2002, 277(8), 6504-6510.

KOVAR, J., M. EHRLICHOVA, B. SMEJKALOVA, I. ZANARDI, et al. Comparison of Cell Death-inducing Effect of Novel Taxane SB-T-1216 and Paclitaxel in Breast Cancer Cells. Anticancer Research, Aug 2009, 29(8), 2951-2960.

LEBEDEVA, I., R. RANDO, J. OJWANG, P. COSSUM, et al. Bcl-xL in prostate cancer cells: Effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity. Cancer Research, Nov 2000, 60(21), 6052-6060.

LEIST, M. AND M. JAATTELA Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. Nature Reviews Molecular Cell Biology, Aug 2001, 2(8), 589-598.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell, Feb 1997, 88(3), 323-331.

LI, H. L., L. BERGERON, V. CRYNS, M. S. PASTERNACK, et al. Activation of caspase-2 in apoptosis. Journal of Biological Chemistry, Aug 1997, 272(34), 21010-21017.

LIAO, P. C. AND C. H. LIEU Cell cycle specific induction of apoptosis and necrosis by paclitaxel in the leukemic U937 cells. Life Sciences, Feb 2005, 76(14), 1623-1639.

LIAO, P. C., S. K. TAN, C. H. LIEU AND H. K. JUNG Involvement of endoplasmic reticulum in paclitaxel-induced apoptosis. Journal of Cellular Biochemistry, Jul 2008, 104(4), 1509-1523.

LIU, B., E. STAREN, T. IWAMURA, H. APPERT, et al. Taxotere resistance in SUIT Taxotere resistance in pancreatic carcinoma cell line SUIT 2 and its sublines. World Journal of Gastroenterology, Dec 2001, 7(6), 855-859.

LIU, C. F., Y. Z. ZHU, W. LOU, N. NADIMINTY, et al. Functional p53 determines docetaxel sensitivity in prostate cancer cells. Prostate, Mar 2013, 73(4), 418-427.

LU, K. H., K. H. LUE, M. C. CHOU AND J. G. CHUNG Paclitaxel induces apoptosis via caspase-3 activation in human osteogenic sarcoma cells (U-2 OS). Journal of Orthopaedic Research, Sep 2005a, 23(5), 988-994.

LU, K. H., K. H. LUE, H. H. LIAO, K. L. LIN, et al. Induction of caspase-3-dependent apoptosis in human leukemia HL-60 cells by paclitaxel. Clinica Chimica Acta, Jul 2005b, 357(1), 65-73.

LUO, Y., Y. LING, W. S. GUO, J. PANG, et al. Docetaxel loaded oleic acid-coated hydroxyapatite nanoparticles enhance the docetaxel-induced apoptosis through activation of caspase-2 in androgen independent prostate cancer cells. Journal of Controlled Release, Oct 2010, 147(2), 278-288.

MA, Y. J. AND L. M. HENDERSHOT The role of the unfolded protein response in tumour development: Friend or foe? Nature Reviews Cancer, Dec 2004, 4(12), 966-977.

MAILLOUX, A., K. GRENET, A. BRUNEEL, B. BENETEAU-BURNAT, et al. Anticancer drugs induce necrosis of human endothelial cells involving both oncosis and apoptosis. European Journal of Cell Biology, Jun 2001, 80(6), 442-449.

MARTELLO, L. A., P. VERDIER-PINARD, H. J. SHEN, L. F. HE, et al. Elevated levels of microtubule destabilizing factors in a Taxol-resistant/dependent A549 cell line with an alpha-tubulin mutation. Cancer Research, Mar 2003, 63(6), 1207-1213.

MCNEISH, I. A., S. BELL, T. MCKAY, T. TENEV, et al. Expression of Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells induces apoptosis predominantly via a caspase-9-mediated pathway and enhances sensitivity to cisplatin and paclitaxel. British Journal of Cancer, Jun 2002, 86, S20-S21.

MECHETNER, E., A. KYSHTOOBAYEVA, S. ZONIS, H. KIM, et al. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. Clinical Cancer Research, Feb 1998, 4(2), 389-398.

MHAIDAT, N., R. THORNE, X. ZHANG AND P. HERSEY Involvement of endoplasmic reticulum stress in Docetaxel-induced JNK-dependent apoptosis of human melanoma. Apoptosis, Dec 2008, 13(12), 1505-1512.

MHAIDAT, N. M., Y. F. WANG, K. A. KIEJDA, X. D. ZHANG, et al. Docetaxel-induced apoptosis in melanoma cells is dependent on activation of caspase-2. Molecular Cancer Therapeutics, Feb 2007, 6(2), 752-761.

MIELGO, A., V. A. TORRES, K. CLAIR, S. BARBERO, et al. Paclitaxel promotes a caspase 8-mediated apoptosis through death effector domain association with microtubules. Oncogene, Oct 2009, 28(40), 3551-3562.

MITRA, A. AND D. SEPT Taxol allosterically alters the dynamics of the tubulin dimer and increases the flexibility of microtubules. Biophysical Journal, Oct 2008, 95(7), 3252-3258.

MONZO, M., R. ROSELL, J. J. SANCHEZ, J. S. LEE, et al. Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations. Journal of Clinical Oncology, Jun 1999, 17(6), 1786-1793.

MORSE, D. L., H. GRAY, C. M. PAYNE AND R. J. GILLIES Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. Molecular Cancer Therapeutics, Oct 2005, 4(10), 1495-1504.

MOZZETTI, S., C. FERLINI, P. CONCOLINO, F. FILIPPETTI, et al. Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients. Clinical Cancer Research, Jan 2005, 11(1), 298-305.

OFIR, R., R. SEIDMAN, T. RABINSKI, M. KRUP, et al. Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. Cell Death and Differentiation, Jun 2002, 9(6), 636-642.

OYAIZU, H., Y. ADACHI, S. TAKETANI, R. TOKUNAGA, et al. A crucial role of caspase 3 and caspase 8 in paclitaxel-induced apoptosis. Mol Cell Biol Res Commun, Jul 1999, 2(1), 36-41

PAN, J. X., G. P. XU AND S. C. J. YEUNG Cytochrome c release is upstream to activation of caspase-9, caspase-8, and caspase-3 in the enhanced apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells induced by manumycin and paclitaxel. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, Oct 2001, 86(10), 4731-4740.

PAN, Z. AND L. GOLLAHON Taxol Directly Induces Endoplasmic Reticulum-Associated Calcium Changes That Promote Apoptosis in Breast Cancer Cells. Breast Journal, Jan-Feb 2011, 17(1), 56-70.

PAN, Z. AND L. GOLLAHON Paclitaxel attenuates Bcl-2 resistance to apoptosis in breast cancer cells through an endoplasmic reticulum-mediated calcium release in a dosage dependent manner. Biochemical and Biophysical Research Communications, Mar 2013, 432(3), 431-437.

PARK, S. J., C. H. WU, J. D. GORDON, X. L. ZHONG, et al. Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. Journal of Biological Chemistry, Dec 2004, 279(49), 51057-51067.

PERKINS, C. L., G. F. FANG, C. N. KIM AND K. N. BHALLA The role of Apaf-1, caspase-9, and bid proteins in etoposide- or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis. Cancer Research, Mar 2000, 60(6), 1645-1653.

RANGANATHAN, S., C. A. BENETATOS, P. J. COLARUSSO, D. W. DEXTER, et al. Altered beta-tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells. British Journal of Cancer, Feb 1998, 77(4), 562-566.

RAUTUREAU, G. J. P., C. L. DAY AND M. G. HINDS Intrinsically Disordered Proteins in Bcl-2 Regulated Apoptosis. International Journal of Molecular Sciences, Apr 2010, 11(4), 1808-1824.

REINECKE, P., T. KALINSKI, C. MAHOTKA, M. SCHMITZ, et al. Paclitaxel/Taxol((R)) sensitivity in human renal cell carcinoma is not determined by the p53 status. Cancer Letters, May 2005, 222(2), 165-171.

RIGAMONTI, L., G. NICOLINI, M. MILOSO, S. GALBIATI, et al. Paclitaxel-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves caspase 7 activation. European Journal of Neuroscience, 2000, 12, 9-9.

RODI, D. J., R. W. JANES, H. J. SANGANEE, R. A. HOLTON, et al. Screening of a library of phage-displayed peptides identifies human Bcl-2 as a taxol binding protein. Journal of Molecular Biology, Jan 1999, 285(1), 197-203.

ROSET, R., L. ORTET AND G. GIL-GOMEZ Role of Bcl-2 family members on apoptosis: what we have learned from knock-out mice. Frontiers in Bioscience, May 2007, 12, 4722-4730.

SCHIFF, P. B., J. FANT AND S. B. HORWITZ Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. Nature, 1979, 277(5698), 665-667.

SCHIFF, P. B. AND S. B. HORWITZ Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5' – triphosphate or microtubule-associated proteins. Biochemistry, 1981, 20(11), 3247-3252.

SCHUYER, M., M. E. L. VAN DER BURG, S. C. HENZEN-LOGMANS, J. H. FIERET, et al. Reduced expression of BAX is associated with poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer: a multifactorial analysis of TP53, p21, BAX and BCL-2. British Journal of Cancer, Nov 2001, 85(9), 1359-1367.

SEIDEN, M. V., K. D. SWENERTON, U. MATULONIS, S. CAMPOS, et al. A phase II study of the MDR inhibitor biricodar (INCEL, VX-710) and paclitaxel in women with advanced ovarian cancer refractory to paclitaxel therapy. Gynecologic Oncology, Sep 2002, 86(3), 302-310.

SERUGA, B., A. OCANA AND I. F. TANNOCK Drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer. Nature Reviews Clinical Oncology, Jan 2011, 8(1), 12-23.

SEVE, P., J. MACKEY, S. ISAAC, O. TREDAN, et al. Class III beta-tubulin expression in tumor cells predicts response and outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving paclitaxel. Molecular Cancer Therapeutics, Dec 2005, 4(12), 2001-2007.

SONG, Z. Y., X. B. YAO AND M. WU Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. Journal of Biological Chemistry, Jun 2003, 278(25), 23130-23140.

SRIVASTAVA, R. K., Q. S. MI, J. M. HARDWICK AND D. L. LONGO Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Mar 1999, 96(7), 3775-3780.

SULLIVAN, K. F. Structure and utilazation of tubulin isotypes. Annual Review of Cell Biology, 1988, 4, 687-716.

SZEGEZDI, E., S. E. LOGUE, A. M. GORMAN AND A. SAMALI Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. Embo Reports, Sep 2006, 7(9), 880-885.

TAI, C. J., J. W. WANG, H. Y. SU, C. K. WANG, et al. Glucose-regulated protein 94 modulates the therapeutic efficacy to taxane in cervical cancer cells. Tumour Biol, Aug 9 2013.

TAN, G. L., H. Q. LI, J. B. CHEN, M. JIANG, et al. Apoptosis induced by low-dose paclitaxel is associated with p53 upregulation in nasopharyngeal carcinoma cells. International Journal of Cancer, Jan 2002, 97(2), 168-172.

THORNBERRY, N. A. AND Y. LAZEBNIK Caspases: Enemies within. Science, Aug 1998, 281(5381), 1312-1316.

TORRES, K. AND S. B. HORWITZ Mechanisms of taxol-induced cell death are concentration dependent. Cancer Research, Aug 1998, 58(16), 3620-3626.

UENO, N. T., C. BARTHOLOMEUSZ, J. L. HERRMANN, Z. ESTROV, et al. E1A-mediated paclitaxel sensitization in HER-2/neu-overexpressing ovarian cancer SKOV3.ip1 through apoptosis involving the caspase-3 pathway. Clinical Cancer Research, Jan 2000, 6(1), 250-259.

WANG, Y. F., C. Y. CHEN, S. F. CHUNG, Y. H. CHIOU, et al. Involvement of oxidative stress and caspase activation in paclitaxel-induced apoptosis of primary effusion lymphoma cells. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, Oct 2004, 54(4), 322-330.

WANG, Y. Q. AND F. CABRAL Paclitaxel resistance in cells with reduced beta-tubulin. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, Jun 2005, 1744(2), 245-255.

WEIGEL, T. L., M. T. LOTZE, P. K. KIM, A. A. AMOSCATO, et al. Paclitaxel-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines is associated with increased caspase-3 activity. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Apr 2000, 119(4), 795-803.

WIEDER, T., F. ESSMANN, A. PROKOP, K. SCHMELZ, et al. Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. Blood, Mar 2001, 97(5), 1378-1387.

WILSON, L., H. P. MILLER, K. W. FARRELL, K. B. SNYDER, et al. Taxol stabilization of microtubules in vitro – dynamics of tubulin addition and loss at opposite microtubule ends. Biochemistry, 1985, 24(19), 5254-5262.

YAMAMOTO, K., H. ICHIJO AND S. J. KORSMEYER BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. Molecular and Cellular Biology, Dec 1999, 19(12), 8469-8478.

YOSHINO, T., H. SHIINA, S. URAKAMI, N. KIKUNO, et al. Bcl-2 expression as a predictive marker of hormone-refractory prostate cancer treated with taxane-based chemotherapy. Clinical Cancer Research, Oct 2006, 12(20), 6116-6124.

YOULE, R. J. AND A. STRASSER The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature Reviews Molecular Cell Biology, Jan 2008, 9(1), 47-59.

YVON, A. M. C., P. WADSWORTH AND M. A. JORDAN Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. Molecular Biology of the Cell, Apr 1999, 10(4), 947-959.

ZONG, W. X., C. LI, G. HATZIVASSILIOU, T. LINDSTEN, et al. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. Journal of Cell Biology, Jul 2003, 162(1), 59-69.

ZAFFARONI, N., M. PENNATI, G. COLELLA, P. PEREGO, et al. Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. Cellular and Molecular Life Sciences, Aug 2002, 59(8), 1406-1412.