

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Daniela Davidková**

Kaspáza-8 – multifunkční proteáza na pomezí apoptózy a nekrózy  
Caspase-8 – a multifunctional protease at the intersection of apoptosis and necrosis

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ladislav Anděra, Csc

Praha, 2017

**Poděkování:**

Velmi děkuji svému školitelovi RNDr. Ladislavu Anděrovi CSc. za trpělivost a cenné rady a připomínky při psaní této práce. Dále také děkuji za podporu mé rodině a přátelům.

**Prohlášení:**

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, 15. 5. 2017

---

Daniela Davídková

## **Abstrakt**

---

Kaspáza-8 je klasifikována jako iniciátorová kaspáza zejména pro receptory smrti indukovanou apoptózu. Exprimuje se ve všech tkáních a v závislosti na způsobu její regulace hraje důležitou roli nejen v signalizaci apoptózy, ale také nekroptózy, přežití buněk a v dalších buněčných procesech. Její správná funkce je nezastupitelná při celkové proliferaci, diferenciaci a vývoji, při fungování imunitních odpovědí a tak udržování homeostázy. Její nesprávné fungování či její absence se projevuje defekty na úrovni buňky i organismu a je spojena se závažnými onemocněními, např. rakovinou. Tato práce shrnuje poznatky o způsobech regulace a funkci kaspázy-8 v těchto procesech.

Klíčová slova: kaspázy, apoptóza, nekróza, nekroptóza, DISC, aktivační komplex

## **Abstract**

---

Caspase-8 is classified as an initiator caspase especially of death receptors-induced apoptosis. It is expressed in all tissues and depending on its regulatory circuits it plays an important role not only in the signalization of apoptosis but also in necroptosis, cell survival and other cellular processes. Its proper function is irreplaceable in general proliferation, differentiation and development, in the function of immune responses and thus maintenance of homeostasis. Its malfunction or absence is manifested by defects in both cells and organisms and it is connected with serious diseases such as cancer. This thesis summarizes the knowledge of ways of regulation and function of caspase-8 in these processes.

Key words: caspases, apoptosis, necrosis, necroptosis, DISC, activation complex

## Seznam použitých zkratek

AIF	Apoptosis-Inducing Factor
ALPS	Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD
Atg5/16	Autophagy protein 5 / 16
Bak	Bcl-2 antagonist/killer 1
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH3	Bcl-2-homology 3 protein
Bid	Bcl-2 interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CARP	Caspase-8/10-associated RING proteins
Cdk1	Cyclin-dependent kinase 1
CED-3	Cell Death protein-3
CpG	Cytidine-phosphate-Guanosine
CrmA	Cytokine response modifier A
DAI	DNA-dependent Activator of Interferon regulatory factor
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
Diablo	Direct IAP-binding protein with low pI
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DR	Death Receptor
E1A	Early region 1A protein
EGF	Epidermal growth factor
FADD	Fas-associated protein with death domain
FLIP	FLICE-like Inhibition Protein
HTRA2	High Temperature Requirement protein A2
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD	inhibitor of caspase-activated DNase
ICE	Interleukin-1 $\beta$ converting enzyme
IRF1/3/7	Interferon regulatory factors 1/3/7
LC3	Light chain 3 structure
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like
NEDD8	Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Downregulated 8 protein
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor- $\kappa$ B
NLRP3	NOD-like receptor family pyrin domain containing 3
PARP	Poly ADP-ribose polymerase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
Plk1	Polo-like kinase 1
RHIM	RIP Homotypic Interaction Motif
RIP1/3	Receptor interacting protein kinase 1/3
RSK2	Ribosomal S6 kinase 2
SHP-1	Src-homology domain 2 containing tyrosine phosphatase-1
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
tBid	truncated Bid
TLR	Toll-like receptor
TNF /R	Tumor necrosis factor / receptor
TRADD	Tumor necrosis factor Receptor Associated Death Domain
TRAF2/5	TNF Receptor Associated Factor 2/5
TRAIL	Tumor Necrosis Factor-related apoptosis-inducing ligand
TRIF	Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

## Obsah

---

1. Úvod.....	1
2. Apoptóza .....	1
3. Kaspázy .....	2
4. Signální dráhy aktivující apoptózu .....	5
4.1. Vnější signální dráha apoptózy .....	5
4.1.1 DISC.....	5
4.1.2. Komplex II .....	6
4.2. Vnitřní signální dráha apoptózy .....	7
4.3. TLR .....	7
5. Nekroptóza .....	8
5.1. Signální dráhy aktivující nekroptózu.....	9
5.1.1 TNFR1 .....	9
5.1.2. CD95 a TRAIL receptory .....	10
5.1.4. TLR.....	10
5.1.5. DAI.....	10
6. Kaspáza-8 .....	11
6.1. Popis kaspázy-8.....	12
6.2. Vznik aktivní konformace kaspázy-8.....	12
6.2.1. Aktivace kaspázy-8 prostřednictvím komplexu DISC.....	13
6.2.2. Autokatalytické štěpení kaspázy .....	14
6.2.3. Aktivace prostřednictvím kardioplipinu .....	15
6.2.4. Aktivace prostřednictvím katepsinu D, efektorových kaspáz .....	15
6.2.5. Aktivace prostřednictvím mikrotubulů, ER, autofagosomu a inflamazomu .....	16
6.3. Regulace aktivace a aktivity kaspázy-8 .....	17
6.3.1. cFLIP .....	17
6.3.2. Virové proteiny Crma a p35.....	18
6.3.3. Fosforylace kaspázy-8 .....	18
6.3.4. Ubiquitinilace a nitrosilace .....	19
6.3.5. Mutace kaspázy-8 a epigenetická regulace její exprese.....	20
6.3.6. Alternativním sestřih kaspázy-8 .....	20
6.3.7. Kaspáza 8 a autofagie .....	21
6.4. Fyziologická role a funkce kaspázy-8 .....	22
6.4.1. Role kaspázy-8 při zánětlivých procesech .....	22
6.4.2. Role kaspázy-8 v proliferaci a vývoji .....	22
6.4.3. Funkce kaspázy-8 při buněčném dělení .....	23
6.4.4. Funkce kaspázy-8 při buněčné motilitě, adhezi buněčného matrix a zrání endozomu .....	23
6.4.5. Funkce kaspázy-8 při buněčné diferenciaci a senescenci .....	24
7. Kaspáza-10 .....	24
8. Závěr .....	25
9. Seznam použité literatury.....	26

## 1. Úvod

---

Apoptóza a stejně tak nekroptóza jsou evolučně konzervované a regulovatelné typy buněčné smrti. Jsou důležité pro udržování homeostázy a správný vývoj organismu a proto je jejich zkoumání důležité pro pochopení široké škály signálních drah a jejich souvislostí, zahrnující také dráhy neindukující smrt. Tyto dráhy jsou aktivovatelné různorodými stimuly od receptorové indukce vnější i vnitřní, po změny v exprimování proteinů uvnitř buňky. Jedním z klíčových proteinů těchto drah je proteáza kaspáza-8. Tato kaspáza má nezastupitelnou roli v indukování apoptózy při stimulaci především vnějších buněčných receptorů smrti. Určitými typy regulace může měnit svou roli v těchto signálních drahách a zprostředkovávat např. přežití buňky, ale také nekroptózu.

## 2. Apoptóza

---

Pravděpodobně prvním, kdo poukázal na existenci regulovatelné buněčné smrti, byl v roce 1842 německý přírodovědec Carl Vogt. Při zkoumání metamorfózy u ropušky starostlivé došel k závěru, že za degradaci ocasu při metamorfóze z pulce na dospělého jedince musí být zodpovědná fyziologická buněčná smrt (Vogt, 1842). Následně pak o více než století později popsali R. Lockshin a M. Williams koncept programované buněčné smrti při metamorfóze bource morušového (Lockshin & Williams, 1964). Pro tuto fyziologickou formu buněčné smrti navrhli J. Kerr, A. Wyllie a A. Currie v roce 1972 termín apoptóza, kdy ji odlišili od projevů nekrotické smrti a původně nazvali jako „shrinkage necrosis“. Slovo apoptóza je převzato z řečtiny, kde znamená opadávání okvětních lístků z květin či listů ze stromu, čímž se poukazuje na přirozené odumírání buněk (Kerr et al., 1972).

Apoptóza je dnes pokládána za nejvýznamnější a nejpoužívanější způsob regulované či programované buněčné smrti. Její průběh je řízen geneticky a je evolučně konzervován. Morfologické projevy apoptózy jsou patrné ve dvou fázích. V první fázi probíhá smršťování buňky a její uvolňování z mezibuněčných kontaktů, fragmentace DNA, kondenzace jádra a cytoplazmy a následný rozpad na apoptotická tělíska. V druhé fázi jsou tato tělíska fagocytována okolními buňkami anebo makrofágy (Shrnuto v Kroemer et al., 1995).

Toto vše je potřeba k udržení homeostázy, správné proliferaci a diferenciaci jak při embryogenezi, kde se například podílí na odstraňování dočasných orgánů nebo vzniku prstů, tak ve vyvinutém organismu, například při poničení tkáně nebo stárnutí. Nesprávné fungování či regulace apoptózy pak může vést jak k letálním poruchám v embryogenezi, tak i

k závažným onemocněním například k autoimunitním nebo neurodegenerativním chorobám či k rakovině (Kerr et al., 1972; Saikumar et al., 1999).

Počáteční podnět pro spuštění apoptózy může pocházet z vnějšku nebo přímo z vnitřku buňky. Vnějšími podněty jsou například navázání ligandu na receptor smrti, absence signálu pro přežití, hormony, cytokiny, toxiny, ionizující záření, oxid dusnatý, virové infekce nebo aktivace imunitní odpovědi. K vnitřním podnětům náleží např. buněčný stres, poškození DNA či proteinů, bakteriální nebo virová infekce, zvýšená přítomnost reaktivních forem kyslíku nebo toxiny. Podle povahy těchto podnětů rozlišujeme vnější a vnitřní signalizační dráhu apoptózy (Saikumar et al., 1999).

### **3. Kaspázy**

---

Pojmenování enzymů esenciálních pro exekuci apoptózy jako kaspázy, je odvozeno z jejich anglického názvu „caspase“ (cysteine-dependent **asp**artate-directed proteases). Obsahují v aktivním místě cystein a štěpící specificky peptidickou vazbu substrátu za asparagovou kyselinou (Alnemri et al., 1996). Kaspázy mají více funkcí. Jsou esenciální také pro spuštění apoptózy, regulují imunitní reakce a regulují determinaci a proliferaci buněk.

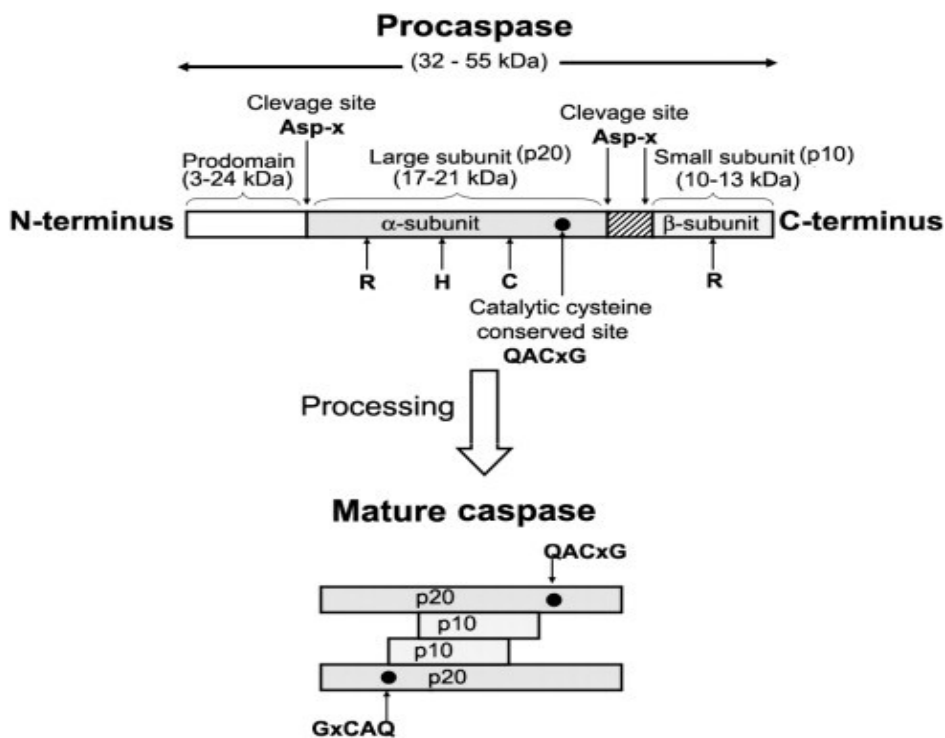
Aktuálně je známo 14 savčích kaspáz, z toho 11 lidských. První objevenou kaspázou u savců byla kaspáza-1. Původně byla pojmenována jako interleukin-1 $\beta$ -konverzující enzym. Její sekvence, hlavně v aktivním místě, se pozoruhodně shodovala se sekvencí CED-3 apoptotického proteinu hlístice *C. elegans* (Thornberry & Molineaux, 2008). Obecně se kaspázy skládají z N-koncové domény, zvané také prodoména, z velké podjednotky p20 (17–20 kDa) a malé podjednotky p10 (10–12 kDa). Jejich aktivní místo je fylogeneticky konzervováno na velké podjednotce v místě Cys285 (číslování podle kaspázy-1) a má podobu pentapeptidu QACxG, kde x může být R, Q nebo G. (Yuan et al., 1993; Fernandes-Alnemri, 1996; Fuentes-Prior & Salvesen, 2004)

Kaspázy jsou syntetizovány v neaktivní formě jako zymogen zvaný prokaspáza. Iniciační prokaspázy jsou monomerní, efektorové prokaspázy tvoří předpřipravené dimery (Boatright et al., 2003). K jejich aktivaci je potřebný prvotní specifický stimul, který vede k proteolytickému štěpení specifických míst za asparagovou kyselinou zymogenu (Asp-x) a vzniku aktivních dimerních kaspáz (Wolf & Green, 1999). (Obr.1)

Katalytické centrum kaspáz je tvořeno 12 antiparalelními beta listy, 6 od každé enzymové jednotky, obklopenými alfa helixy. Aktivní kaspáza, např. efektorová kaspáza-3,

vytváří dimer dimerů velké a malé podjednotky a tudíž obsahuje dvě aktivní místa rozmístěna symetricky každé na jedné straně kaspázy. Výjimku tvoří kaspáza-9, která má pouze jedno katalytické místo (Renatus et al., 2001). Katalytické centrum lze svým uspořádáním rozlišit na 4 smyčky L1-L4. Smyčka L1 a část smyčky L2, kde se nachází katalytický Cys285, se vyskytují na velké podjednotce. L3 a L4 smyčky se vyskytují na malé podjednotce. Tyto smyčky vymezují čtyři vazebná místa S1-S4 specificky rozpoznávající substrát podle aminokyselin P1-P4 (Shrnuto v Shi, 2002).

Kaspázy štěpí substrát za C-koncovou aminokyselinou P1. S1 místo, které rozeznává P1 místo substrátu, je u všech kaspáz tvořeno smyčkami L1, L2 a L3. Geometrie tohoto místa je pro kaspázy specifická a v naprosté většině se sem dokáže navázat pouze aspargová aminokyselina (Earnshaw et al., 1999). Rozpoznávanou majoritní P3 aminokyselinou u savčích kaspáz je glutamová kyselina. Štěpné místo substrátu se tak dá zobecnit na Asp-X-Glu-X. Schopnost štěpit odlišné substráty je dána především S4 místem, které je tvořeno L4 smyčkou (Thornberry et al., 1997; Shi, 2002).



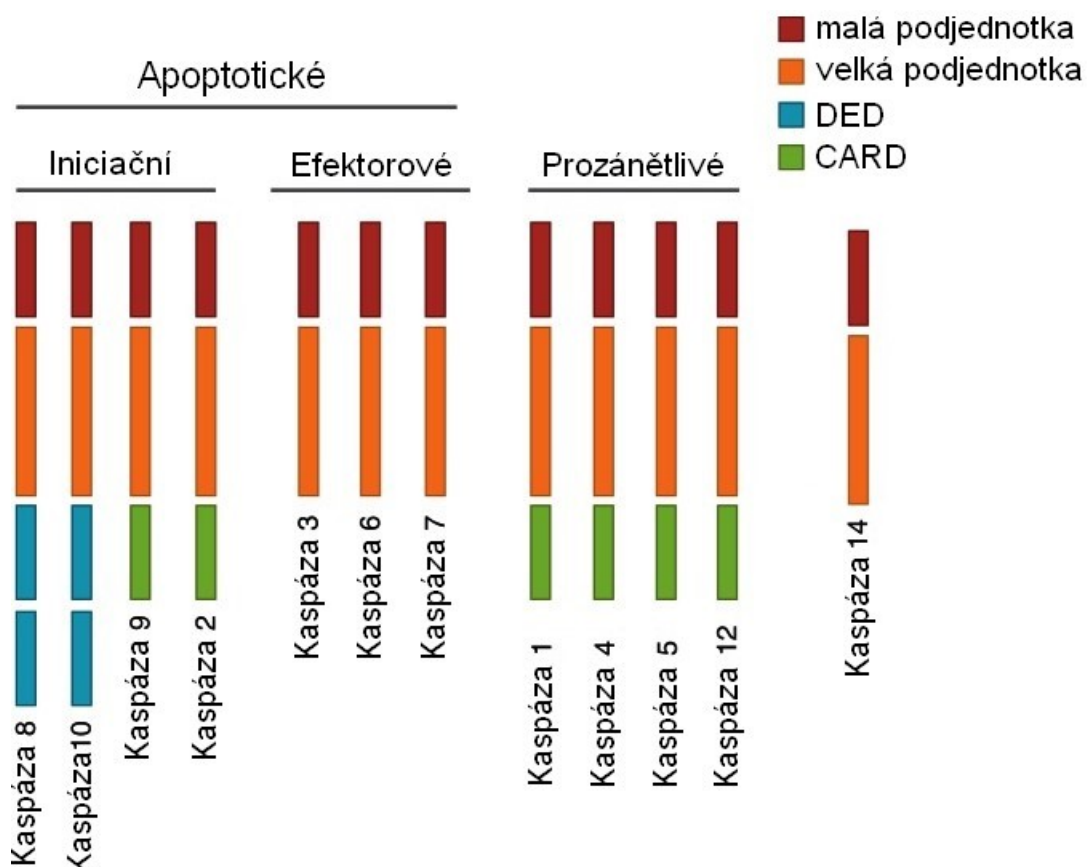
**Obr. 1: Struktura savčí prokaspázy a kaspázy (převzato z Chowdhury et al., 2008)**

Zobrazení prodomény, velké podjednotky p20, malé podjednotky p10, štěpných míst Asp-x a katalytického cysteinového místa QACxG u prokaspázy a zobrazení aktivní kaspázy složené z heterotetrameru podjednotek p20 a p10.



Určité sekvenční a strukturní rozdíly v délce N-koncové prodomény rozdělují kaspázy na ty s dlouhou prodoménou (kaspázy-1,-2,-4,-5,-8,-9,-10,-11,-12,-13) a pak s krátkou prodoménou (kaspázy-3,-6,-7,-14). V dlouhé prodoméně se vyskytují protein-protein interagující motivy z rodiny domén smrti zvané smrt způsobující domény (death effektor domains, DEDs) a kaspázu aktivující a rekrutující domény (caspase activation and recruitment domains, CARDs). DED domény se vyskytují u kaspázy-8 a -10, CARD domény u kaspáz-1,-2,-4,-5,-9,-11,-12 a -13.

Kaspázy rozdělujeme také na základě funkce na proapoptické a prozánětlivé. Apoptotické dále dělíme na iniciační, kam se řadí kaspázy -2,-8,-9 a -10 a na efektorové, kam se řadí kaspázy -3,-6 a -7. Mezi prozánětlivé kaspázy řadíme kaspázy-1,-4,-5,-11,-12 a -13 (Kumar, 1999; Wolf & Green, 1999). Toto rozdělení ale nemusí být vždy stoprocentní. Například u kaspázy-2 dodnes není jasně daná funkce. Svou strukturou má nejbliž iniciačním kaspázám, ale specifita štěpení je velmi blízká efektorovým kaspázám (Wejda et al., 2012). Dalším příkladem je kaspáza-14, u které dokonce nebyla prokázána žádná účast na apoptóze či při zánětu (Lippens et al., 2000), avšak účastní se štěpením filaggrinu tvorby pokožky (Hoste et al., 2011).



Obr. 2: Přehled kaspáz a jejich domén. (upraveno podle McIlwain et al., 2013)

## 4. Signální dráhy aktivující apoptózu

---

### 4.1. Vnější signální dráha apoptózy

---

Vnější apoptotická signální dráha se aktivuje zejména interakcí ligandů smrti s odpovídajícími receptory na povrchu buňky. Receptory smrti (death receptor, DR) jsou transmembránové proteiny patřící do rodiny TNFR - receptoru pro tumor nekrotizující faktor (TNF). Jejich extracelulární domény jsou bohaté na cystein a zprostředkovávají vazbu ligandu (Locksley et al., 2001). V cytosolické části se nachází doména smrti (death domain DD). Mezi dobře známé receptory smrti a jejich ligandy patří TNFR1 a TNF $\alpha$ , CD95 (Fas) a CD95L, TRAIL-R1(DR4)/TRAIL-R2(DR5) a Apo2L/TRAIL. Při aktivaci ligandem se receptory oligomerizují a na domény smrti receptoru se díky své doméně smrti mohou navázat adaptorové a následně i další signální proteiny. Vzniká tak buď tzv. smrt indukující signalizační komplex (DISC) a to u receptorů CD95 a TRAIL-R1/TRAIL-R2 nebo vzniká tzv. Komplex I u TNFR1 receptoru. Komplex I běžně spouští dráhu MAPK (mitogen-activated protein kinase) a dráhu pro aktivaci a jadernou translokaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B (Nuclear factor- $\kappa$ B), ale může dojít k translokaci komplexu do cytosolu a ke vzniku pro-apoptického Komplexu II. Jak DISC, tak Komplex II ve výsledku aktivují prokaspázy-8 nebo -10. Aktivované kaspázy dále aktivují efektorové prokaspázy a dochází k apoptóze buňky (Shrnuto v Ashkenazi a Dixit, 1998; Lavrik et al., 2005).

#### 4.1.1 DISC

---

Po aktivaci receptoru CD95 nebo receptorů pro TRAIL se na jejich cytosolické domény smrti naváže svými doménami smrti adaptérový protein FADD (Fas-associated protein with death domain). Ten také obsahuje smrt způsobující domény (death effector domain DED), které interagují s DED na N-konci prokaspázy-8, -10 a c-FLIP (celulární FLICE inhibiční protein) (Muzio et al., 1996; Scaffidi et al., 1999; Sprick et al., 2000, 2002). Prokaspázy-8/-10 mohou tvořit tzv. DED řetězce díky interakci jejich DED domén, čímž prokaspáza-8 může vytvořit homodimery, které jsou nutné k její maturaci. Délka řetězců prokaspázy-8 se mění v závislosti na síle indukce. Tímto vzniká komplex zvaný DISC, kde dochází k autoproteolytickému sestřihu prokaspázy-8 a její maturaci na kaspázu-8 (Martin et al., 1998; Muzio et al., 1998; Chang et al., 2003; Schleich et al., 2012).

Ne u všech buněk vzniká při stimulaci CD95 stejné množství DISC komplexů. Konkrétně lze buňky rozdělit do dvou typů. Na buňky typu I, což jsou např. lymfocyty a thymocyty, kde typicky vzniká velké množství aktivních DISC komplexů a tak i molekul

aktivní kaspázy-8. Kaspázy-8 zde tak přímo aktivují efektorové kaspázy-3, -6 a -7 a přímo tak indukují apoptózu. Naopak v buňkách typu II, jako např. hepatocyty, fibroblasty nebo pankreatické  $\beta$  buňky, dochází k výrazně nižší aktivaci kaspázy-8 a je potřeba signál vedoucí k apoptóze amplifikovat. Dochází k tomu působením kaspázou-8 štěpeného proteinu Bid z rodiny Bcl-2 proteinů (B-cell lymphoma 2), který dále aktivuje vnitřní mitochondriální signální dráhu apoptózy. Tento typ zesílení apoptotického signálu je esenciální například pro hepatocyty (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Scaffidi et al., 1998; Yin et al., 1999).

Aktivované CD95 či TRAIL receptory mohou také indukovat vznik sekundárních cytoplasmatických komplexů a tak pokračovat v indukci apoptózy. Například ale TRAIL-R sekundární komplex může dále interagovat s RIP1 a TRAF2 a aktivovat dráhu NF- $\kappa$ B, MAPK a c-Jun (Varfolomeev et al., 2005; Lavrik et al., 2008; Grunert et al., 2012) a zřejmě také nekroptózu.

#### 4.1.2. Komplex II

---

Po aktivaci receptoru TNFR1 se na cytosolickou DD naváže svou DD adaptorový protein TRADD (Tumor necrosis factor Receptor Associated Death Domain). Ten dále interaguje s RIP1 (Receptor interacting protein kinase 1), s TRAF2 a/nebo s TRAF5 (TNF Receptor Associated Factor). Na TRAF2 se navíc navazují E3 ligázy cIAPs (cellular inhibitor of apoptosis proteins) a ty ubiquitinují RIP1 (Varfolomeev et al., 2008). Tímto se vytvoří tzv. Komplex I. Následně dochází ke spuštění různých signálních drah. Jednou z primárně spouštěných drah je ve výsledku aktivace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, anebo aktivace transkripčního faktoru c-Jun. Sekundárně může Komplex I vytvořit Komplex II a spouštět tak apoptózu či nekroptózu (Micheau & Tschopp, 2003).

Komplex II vzniká, pokud dojde k deubiquitinaci RIP1, např. díky působením enzymu CYLD, nebo k jeho ubiquitinaci vůbec nedojde. Tímto se translokuje Komplex I od receptoru do cytoplazmy a pokud je přítomna funkční prokaspáza-8 a nedochází k její inhibici, komplex se dále mění na obdobu DISC komplexu tzv. Komplex IIa nebo Komplex IIb. Komplex IIa vzniká častěji a obsahuje nadále TRADD, který prostřednictvím DD naváže FADD a prokaspázu-8 a neobsahuje RIP1 protein (He et al., 2009). Komplex IIb vzniká působením např. Smac mimetic, které degradují cIAPs a tím zamezují ubiquitinaci RIP1. V tomto případě vzniklý komplex neobsahuje TRADD a adaptorovým proteinem pro navázání FADD je RIP1. Výsledkem obou komplexů je plně maturovaná kaspáza-8 indukující apoptózu (Micheau & Tschopp, 2003; O'Donnell et al., 2007; Varfolomeev et al., 2008; Wang et al., 2008).

## 4.2. Vnitřní signální dráha apoptózy

---

Vnitřní signální dráha je aktivována především pro-apoptotickými stimuly, jako jsou poškození DNA, oxidativní stres, hypoxie, nedostatek živin apod. Centrálním aktivačním místem jsou mitochondrie. Regulace probíhá na základě proteinů rodiny Bcl-2. Ty se dělí na anti-apoptotické, kam se řadí např. Bcl-2 a pro-apoptotické, kam patří proteiny např. Bax, Bak a Bid. Při homeostatickém stavu anti-apoptotické proteiny zabraňují indukci apoptózy blokováním funkce pro-apoptotickým proteinům. Pro-apoptotické stimuly vedou k aktivaci tzv. BH3-pouze proteinů, mezi něž náleží např. již zmíněný Bid, resp. jeho kaspázou-8 štěpený fragment (truncated Bid, tBid). Ty pak blokují anti-apoptotické Bcl-2 proteiny a některé z nich (např. tBid či Bim) tak i mohou aktivovat pro-apoptotické Bax či Bak proteiny. Následně dojde k oligomerizaci Bax či Bak proteinů ve vnější mitochondriální membráně, která umožní vytvoření pórů v této membráně a tak její permeabilizaci. Tím se také inaktivuje mitochondriální membránový potenciál a dojde k uvolněním cytochromu c, SMAC/Diablo proteinů (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases / Direct IAP-binding protein with low pI), AIF (Apoptosis-Inducing Factor) a HTRA2 (High Temperature Requirement protein A2) do cytosolu. Cytochrom C v cytosolu interaguje s adaptorovým proteinem Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), který obsahuje CARD doménu a může tak navázat prokaspázu-9. Díky interakci Apaf-1 a cytochromu C se může navázat také dATP a následně pak prokaspáza-9 a vytvoří se tak proteinový komplex zvaný apoptosom, kde dochází k autoaktivaci kaspázy-9. Ta dále může štěpením aktivovat efektorové kaspázy. Proteiny SMAC/DIABLO a HTRA2 jsou schopné vázat se na IAP (inhibitor apoptotických proteinů), čímž inhibují jejich schopnost blokovat aktivované kaspázy (Scaffidi et al., 1998; Du et al., 2000; Wang, 2001; Strasser, 2005; Westphal et al., 2011; Lalaoui et al., 2015).

Aktivované efektorové kaspázy-3, -6 a -7 jsou hlavními vykonavateli apoptotické buněčné smrti - například štěpením laminu A i B, PARP (poly ADP-ribose polymerase) a ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) a dalších esenciálních proteinů (Slee et al., 2001).

Z aktivace proteinu Bid kaspázou-8 je zřejmé, že vnější a vnitřní dráha apoptózy nejsou striktně oddělené mechanismy.

## 4.3. TLR

---

Buňky mohou aktivovat kaspázu-8 také bez vnějších stimulů jako TNF, TRAIL nebo CD95L a také bez vlivu mitochondrií a to pomocí komplexu nazvaného ripoptozom. Vznik ripoptozomu byl popsán u buněk po stimulaci Toll-like receptorů.

TLRs (Toll-like receptory) u lidí rozpoznávají přítomnost patogenů (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs) a molekul z poškozených a nekrotických buněk (damage-associated molecular patterns – DAMPs). Při jejich detekci dochází hlavně ke stimulaci dráhy NF- $\kappa$ B, MAPK a IRF3 a IRF7 (interferon regultory factors), což vede k expresi interferonů a chemokinů. Konkrétně TLR2 interaguje např. s peptidoglykany (PGN) a lipopeptidy, TLR3 s virální dsRNA, interferonovou RNA a RNA z poškozených buněk, TLR4 s bakteriálními lipopolysacharidy (LPS), TLR5 bakteriální flagelin, TLR7 a TLR8 s virální a bakteriální ssRNA, TLR9 s nemetylovanými CpG DNA motivy (cytidine-phosphate-guanosine) a TLR10 pak např. s faktory chřipkové infekce (Shrnuto v Kawasaki a Kawai, 2014).

Sekundárně TLR mohou indukovat také apoptózu a nekrózu zejména za nepřítomnosti cIAP1, cIAP2 a XIAP. Nejlépe je tato indukce prozkoumána u TLR3 a 4. Jeden z jejich adaptorových proteinů TRIF (Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) obsahuje doménu RHIM (RIP homotypic interaction motif), díky které je schopný se vázat s RIP1. Ten v přítomnosti RIP3 (receptor interacting protein kinase 3) dále interaguje s FADD a prokaspázou-8 za vzniku tzv. ripoptozomu a spouští apoptózu. U TLR může docházet i k autokrinní buněčné smrti a to zvýšením exprese a aktivací receptorů smrti (Gressner et al., 2005). Vnější autokrinní indukce se děje díky již exprimovaným ligandům TNF. Tato indukce pomocí ripoptozomu je velmi podobná indukci Komplexu II, ten ale vychází z Komplexu I po aktivaci receptorů a je tedy jiného původu a proto jsou rozlišeny jiným pojmenováním (Kaiser & Offermann, 2005; Feoktistova et al., 2011; Sun et al., 2011; Tenev et al., 2011; Liu et al., 2016).

Apoptózu spuštěnou TLR3 lze indukovat také komplexem, který je ripoptozomu velmi podobný, ale již neobsahuje FADD. K aktivaci kaspázy-8 je potřeba pouze TRIF a RIP1 (Estornes et al., 2012).

## **5. Nekroptóza**

---

Nekróza byla dlouhou dobu považována za neregulovatelný a nekontrolovatelný proces. Opak, a tedy regulovatelnost, dokázala až zjištění jako například, že nekróza, stejně jako apoptóza, je aktivovatelná stejnou molekulou a to TNF $\alpha$  (Laster et al., 1988) skrze kinázu RIP1 (Chan et al., 2003), jejíž inhibicí necrostatinem-1 dochází k inhibici i k potlačení této regulovatelné nekrózy zvané nekroptóza (Degterev et al., 2005, 2008).

Na tomto základě a skutečnosti, že se nekróza indukovaná receptory smrti morfologicky neliší v různých typech buněk, se vymezipily dva typy nekrózy. Náhodná nerelugovaná nekróza a regulované nekrózy jako např. nekroptóza (Degterev et al., 2005). Náhodou nekrózu můžeme pozorovat například při mechanickém, chemickém či energetickém poškození buňky, zatímco nekroptóza je regulovaný typ nekrózy nezávislá na kaspázách. Nekroptóza je typická zvětšením objemu organel, permeabilizací cytoplasmatické membrány a vylitím buněčného obsahu. Indukována může být přes TNFR1 receptor, CD95 receptor, TRAIL receptor, TLR nebo virovou infekcí přes DAI (DNA-dependent activator of interferon regulatory factor). Jejich aktivační signální dráhy jsou sice různé, ale ve všech případech dochází k aktivaci RIP3. Aktivovaná RIP3 fosforyluje pseudokinázu MLKL (mixed lineage kinase domain-like), vlivem které následně dochází k permeabilizaci mitochondriální membrány (Sun et al., 2012; Zhao et al., 2012). Nekroptický signál se k těmto kinázám dostává pomocí proteinů s RHIM motivem (RIP homology interaction motif) kterými jsou například RIP1, DAI nebo TRIF (Holler et al., 2000). Další působení aktivované MLKL stále není úplně jasná. Zatím bylo zjištěno, že je schopna ovlivňovat iontový kanál TRMP7, což způsobuje jeden z klasických znaků nekrózy a tím je vtok  $Ca^{2+}$  iontů (Cai et al., 2014). Také velmi pravděpodobně ovlivňuje vtok  $Na^{+}$  iontů prostřednictvím  $Na^{+}$  kanálů (Chen et al., 2014). Je také možné, že aktivací oligomerizovaná MLKL je schopna přímo ovlivňovat vznik pórů v plazmatických membránách díky své možnosti se vázat na fosfatidylinositol lipidy and kardiolipiny (Wang et al., 2014).

Některými receptory je spouštěna také apoptóza a dokonce sdílí některé části signálních drah. Závisí právě na míře indukce či poškození buňky. Čím je vyšší, tím větší je pravděpodobnost spuštění nekroptózy. K nekroptóze také dochází v případě inhibice kaspáz. Zdá se, že nekroptóza je záložním plánem, jak zlikvidovat buňku v případě selhání indukce apoptózy (Proskuryakov et al., 2003; Orrenius et al., 2011).

## 5.1. Signální dráhy aktivující nekroptózu

---

### 5.1.1 TNFR1

---

Jak je popsáno u apoptózy, stimulací TNFR1 se může vytvořit Komplex II. V případě nefunkční nebo inhibované prokaspázy-8 dochází k rekrutování protein kinázy RIP3 (Sun et al., 2002) a dojde tak k vytvoření tzv. nekrozomu. Opět může být ve formě s nebo bez TRADD. (popsáno u apoptózy) Dále obsahuje FADD, prokaspázu-8, RIP1 a RIP3. U RIP1 a RIP3 poté dojde k sérii vzájemných fosforylací, (He et al., 2009; Cho et al., 2009) což umožní

RIP3 fosforylovat pseudokinázu MLKL a indukovat buněčnou smrt (Sun et al., 2012; Zhao et al., 2012).

#### 5.1.2. CD95 a TRAIL receptory

---

CD95 při blokaci kaspázy-8 dokáže indukovat také nekrózu (Holler et al., 2000; Matsumura et al., 2000). Genová inaktivace RIP3 a kaspázy-8 u myši ukázala, že k indukci nekroptózy je potřeba RIP1 a RIP3, což naznačuje, že signalizace nekroptózy nejspíš dále pokračuje jako u ostatních zjištěných indukci přes MLKL (Kaiser et al., 2011; Oberst et al., 2011). Je také možné, že k nekroptóze dochází přes sekundární cytoplazmatický komplex, který byl objeven při deleci cIAPs a při kterém disociovaný DISC tvořený FADD a kaspázou-8 se váže spolu s RIP1 (Geserick et al., 2009).

TRAIL indukovaná nekroptóza probíhá přes sekundární cytoplazmatický komplex popsáný u apoptózy a to podobným mechanismem jako KomplexII. Tedy také prostřednictvím RIP1 a RIP3 a následnou aktivací MLKL (Varfolomeev et al., 2005; Jouan-Lanhouet et al., 2012).

#### 5.1.4. TLR

---

Nekróza při indukci TLR3 a 4 probíhá v případě inhibice či delece kaspázy-8 prostřednictvím ripoptozomu. Jako u apoptózy je potřeba adaptorový protein TRIF, ale již není nutný RIP1. TRIF je schopný se přímo vázat s RIP3 a indukovat tak nekroptózu přes MLKL. U ostatních TLR nejspíš dochází k indukci nekrózy nepřímo. TRIF mají pouze TLR3 a 4, ostatní TLR využívají adaptorový protein MyD88 k exprimování TNF $\alpha$  a spuštění nekroptózy autokrinně přes TNFR1 (Feoktistova et al., 2011; Tenev et al., 2011; Kaiser et al., 2013; Kim & Li, 2013).

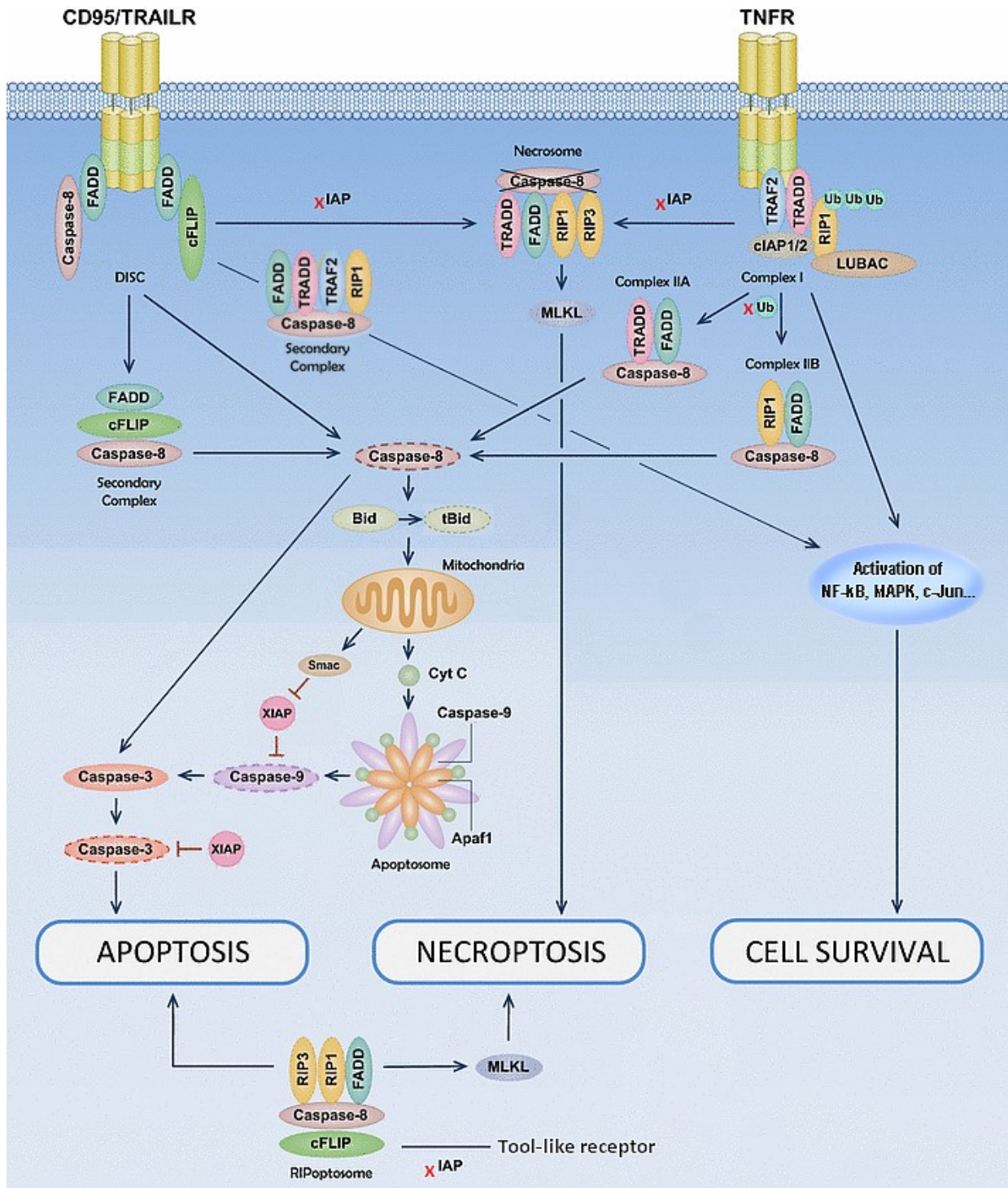
#### 5.1.5. DAI

---

DAI (DNA-dependent activator of interferon regulatory factors) je buněčný senzor rozeznávající cizorodé DNA a rozpoznávající tak hlavně virusovou DNA. Obsahuje RHIM-like motivy a je tak schopen se vázat na RIP1 nebo RIP3. Po stimulaci většinou aktivuje IRF3 a NF- $\kappa$ B, což vede k syntéze interferonů a cytokinů. Nekroptická kaskáda je spuštěna vytvořením komplexu DAI-RIP3 (Upton et al., 2012).

## 6. Kaspáza-8

Z předchozího popisu je zřejmé, že kaspáza-8 hraje důležitou roli jak v signalizaci apoptózy, tak také nekroptózy a buněčného přežití. Důležitou roli má také u jiných procesů.



**Obr.3:** Zjednodušené zobrazení kaspázy-8 v signálních drahách apoptózy, nekroptózy a buněčného přežití prostřednictvím drah CD95 receptoru, TRAIL-R, TNFR, TLR a mitochondrie.

Podrobný popis u kapitol 4. a 5.1. (upraveno podle Zamaraev et al., 2015)



## 6.1. Popis kaspázy-8

---

Poprvé byla kaspáza-8 popsána v roce 1996. Exprese její RNA probíhá nejvíce v lymfoidních orgánech, játrech či slinivce a především v lymfocytech periferní krve. (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996) Gen kaspázy 8 CASP8 se u lidí vyskytuje na dlouhém raménku 2. chromozomu v místě q33-34. Obsahuje 11 exonů o délce cca 30kb. S ním se zde vyskytují i jeho paralogy, gen kaspázy-10 CASP10 a gen proteinu c-FLIP CFLAR (CASP8 a FADD-like apoptosis regulator). Všechny tři geny kódují 2 DED a CASP10 navíc i katalyticky funkční C-koncovou doménu. Vzhledem k jejich genové podobnosti, blízké vzdálenosti cca 20-30kb a faktu, že jejich transkripce probíhá ve stejném směru, se dá předpokládat, že tyto geny vznikly genovou duplikací ze společného předka (Fernandes-Alnemri et al., 1996; Irmeler et al., 1997; Rasper et al., 1998; Grenet et al., 1999). Možnost jednoho společného předka paralogů kaspázy-8 potvrzují i objevy těchto paralogů napříč obratlovci. Všechny tyto tři geny ve vysoké podobnosti byly nalezeny u ostatních savců a u ostatních tetrapodů. Kromě placentálních savců a lalokoploutvých byl objeven i další paralog CASP8 a to gen pro kaspázu-18 CASP18. Ten vznikl nejspíš podobně jako ostatní paralogy a to duplikací společného předka. U placentálních savců je tedy evolučně ztracen. U ryb, konkrétně např. u Dánia pruhozaného se vyskytuje místo CASP18 gen card-casp. Výsledná kaspáza místo dvou DED domén obsahuje CARD doménu. Vzhledem k tomu, že došlo ke chromozomální segregaci a tyto čtyři geny se vyskytují na různých chromozomech, je možné, že card-casp má původce v CASP18 (Sakata et al., 2007; Sakamaki & Satou, 2009; Sakamaki et al., 2015). Gen kaspázy-8 byl kromě u lidí také dobře prozkoumán u myši. Myší gen kaspázy-8 se vyskytuje na 1 chromozomu a obsahuje 8 exonů. (Varfolomeev et al., 1998).

## 6.2. Vznik aktivní konformace kaspázy-8

---

Lidská kaspáza-8 má alespoň 8 možných transkripčních izoform (Boldin et al., 1996), z nich se nejběžněji translatují 2 izoformy. Prokaspáza-8a s délkou p55 a prokaspáza-8b s délkou p53. Rozdílně dlouhé jsou prodomény (p43/p41), malá (p10) a velká (p18) podjednotka jsou u obou izoform stejně dlouhé (Scaffidi et al., 1997). Maturací tak vznikají identické kaspázy-8. Katalytické místo má podobu pentapeptidu QACQG (Fernandes-Alnemri et al., 1996).

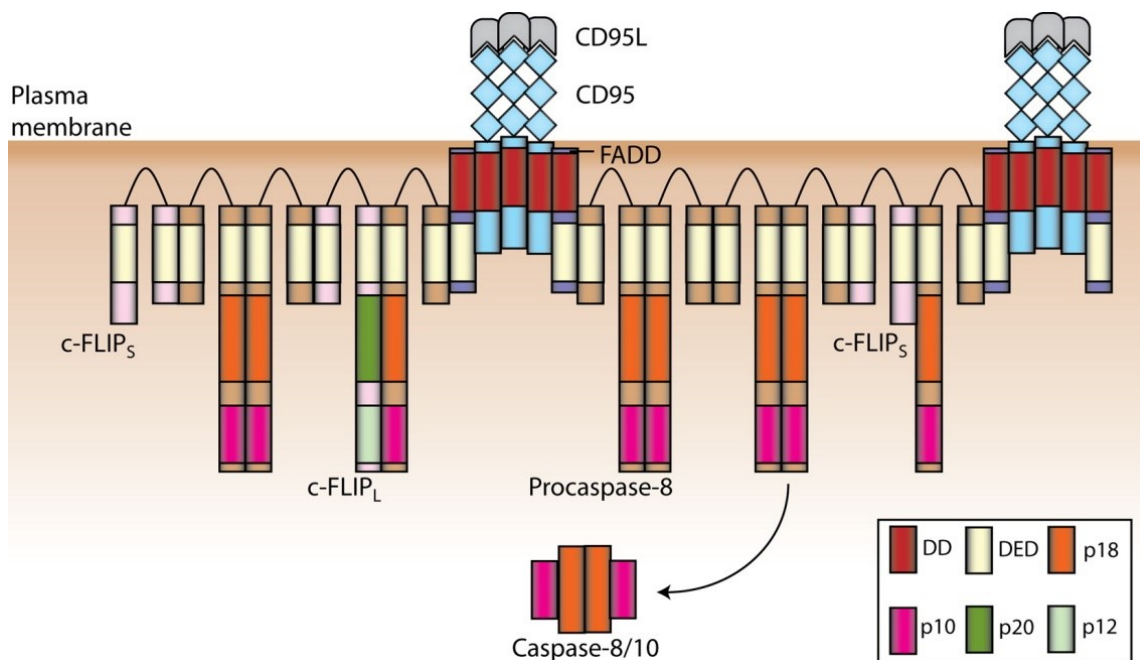
Aby mohla kaspáza-8 dosáhnout maturovaného stavu a indukovat apoptózu, je potřeba vytvoření dimeru ze dvou zymogenů a následné autokatalytické štěpení. Dimerizace/multimerizace probíhá v multiproteinovém komplexu DISC či jeho obdobách v

intracelulárních aktivačních komplexech (např. v Komplexu II). DISC obsahuje důležitý adaptorový protein FADD, který zprostředkovává dimerizaci zymogenů prostřednictvím homotypických interakcí DED zymogenů a DED FADD proteinu (Muzio et al., 1996). Dimerizace je stěžejním dějem pro úspěšnou aktivaci kaspázy a její aktivace na DISC komplexu byla popsána jako tzv. model aktivace indukovanou blízkostí kaspázy-8 (Muzio et al., 1998; Boatright et al., 2003). Autokatalytické štěpení má stabilizační povahu a umožňuje uvolnění kaspázy-8 z DISCu (Donepudi et al., 2003).

#### 6.2.1. Aktivace kaspázy-8 prostřednictvím komplexu DISC

---

Stimulovaný receptor CD95 pravděpodobně multimerizuje a tvoří komplexy s dalšími receptory. Může se tak navázat více FADD proteinů (Scott et al., 2009). Jeden FADD protein navazuje jeden zymogen kaspázy-8. Díky homotypickým interakcím DED se mohou na již navázaný zymogen vázat další a tvořit tak řetězce (Obr. 4). Délka řetězců závisí na síle stimulace. Silná stimulace utváří krátké řetězce, slabá stimulace zase dlouhé řetězce. Toto je pravděpodobně dáno kvůli limitovanému množství kaspázy-8. Silná stimulace stimuluje vysoký počet receptorů, na nichž se utváří krátké řetězce a naopak slabá stimulace stimuluje malý počet receptorů a tak zde vznikají dlouhé řetězce. Na DISC se navazují také jiné proteiny s DED doménami jako prokaspáza-10 a cFLIP, které se také navazují do řetězců. Při indukci apoptózy se jich navazuje až desetkrát méně než prokaspázy-8. Pozoruhodné je, že při slabé stimulaci se ve vzniklém řetězci zvyšuje výskyt cFLIP proteinu (Schleich et al., 2012). Pro efektivní aktivaci kaspázy pravděpodobně musí být v těsné blízkosti alespoň 4 prokaspázy. Jeden vytvořený dimer dokáže aktivovat sousední dimer, a proto tvoření řetězců nebrání v aktivaci kaspázy (Chang et al., 2003). Také u signalizace přes TRAIL receptor se kaspáza aktivuje na DISC komplexu tvořením řetězců (Dickens et al., 2012). Tvoření řetězců se dá předpokládat také u indukce přes Komplex II či TLR3, zatím to ale nebylo prokázáno.

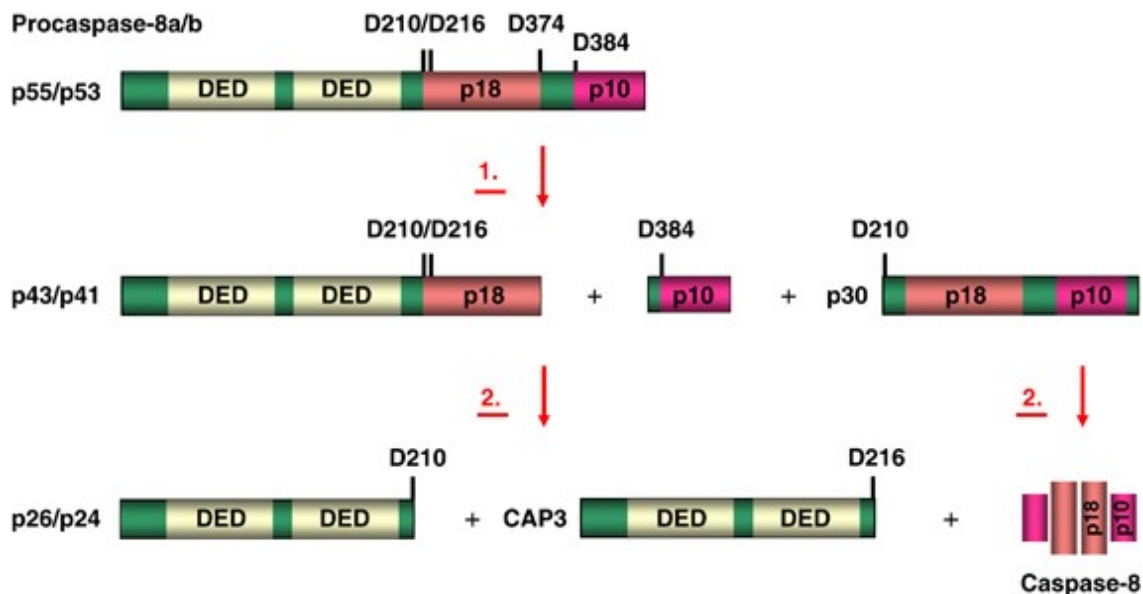


**Obr. 4: Schématické zobrazení tvoření DED řetězců na komplexu DISC.**

Oligomerizovaný receptor na sebe váže protein FADD, který homotypickými interakcemi navazuje DED motivy prokaspázy-8, prokaspázy-10 a cFLIPL, S a R. Naznačeno je také propojení a tak tvoření komplexů mezi receptory (převzato z Schleich et al., 2012).

### 6.2.2. Autokatalytické štěpení kaspázy

Maturační štěpení u prokaspázy-8 probíhá ve dvou krocích. V prvním dojde k odštěpení prodomény za vzniku prodoménového produktu p26/24 a proteázového produktu p30 nebo dojde ke štěpení mezi malou a velkou podjednotkou za vzniku p43/p41 produktu a vzniku produktu malé podjednotky p10. V druhém kroku dojde ke zbývajícimu štěpení a tak ke vzniku samostatné prodomény a velké a malé podjednotky. Velká a malá podjednotka ve výsledku mezi sebou interagují a vzniká aktivní kaspáza-8, která je uvolněna do cytoplazmy (Salvesen & Dixit, 1997; Lavrik & Krammer, 2012) (Obr. 5).



**Obr. 5: Schématické zobrazení maturačního štěpení prokaspázy-8  
(převzato z Lavrik a Krammer, 2012)**

Zobrazení prokaspázy-8a/b p55/p53 a jejich štěpných míst a následné zobrazení štěpných produktů: p43/p41 produkt obsahující prodoménu a velkou podjednotku, p10 produkt s malou podjednotkou, p30 produkt s malou a velkou podjednotkou, p26/p24 a CAP3 produkt s prodoménu a produkt aktivní kaspázy-8.

### 6.2.3. Aktivace prostřednictvím kardiolipinu

Pro úspěšnou indukci apoptózy v buňkách typu II je zapotřebí amplifikovat signál pomocí mitochondriální dráhy apoptózy. Po stimulaci CD95 receptoru se kaspáza translokuje na mitochondriální membránu, kde jí k dimerizaci a aktivaci utváří potřebnou platformu kardiolipin. Aktivní kaspáza pak zůstává včleněná do vnější mitochondriální membrány. Jelikož kardiolipin navazuje také protein Bid, kaspáza jej může štěpit navázaná na mitochondrii a indukovat apoptózu (Lutter et al., 2000; Gonzalez et al., 2008).

### 6.2.4. Aktivace prostřednictvím katepsinu D, efektorových kaspáz

Kaspáza-8 může být aktivovaná také bez indukce receptorem. Například v neutrofilech je kaspáza-8 aktivována katepsinem D, který štěpí kaspázu v místě Leu237, Met383 a Leu443. (Conus et al., 2008, 2012).

Také efektorové kaspázy-3 a -6 mohou štěpit a tím i aktivovat kaspázu-8 a tím přispívat k amplifikaci pro-apoptotické signalizace. Bylo prokázáno, že v Jurkat buňkách s inhibovanou kaspázou-6 je apoptóza potlačena a naopak v kontrolních buňkách docházelo k indukci apoptózy a to v přímé závislosti na přítomnosti kaspázy-8 (Cowling & Downward, 2002; Ferreira et al., 2012). Jelikož existují studie, že kaspáza-8 musí být pro svou aktivaci také dimerizována, mechanismus této amplifikace není zcela objasněn. Možným vysvětlením aktivace kaspázy bez komplexu umožňujícího dimerizaci může být zjištění, že malý podíl prokaspázy-8 přirozeně tvoří dimery až oligomery (Murphy et al., 2004).

#### 6.2.5. Aktivace prostřednictvím mikrotubulů, ER, autofagosomu a inflamazomu

Mikrotubuly mohou zprostředkovávat indukci apoptózy poskytnutím platformy pro aktivaci kaspázy-8 a to skrze interakci s jejími DED doménami. Ty dokonce mohou tvořit řetězce a také umožňovat aktivaci kaspázy-8. Pouze část s DED doménami kaspázy-8 má její krátká izoforma kaspáza-8s, která tak pravděpodobně může zprostředkovávat tvoření těchto DED řetězců (Mielgo et al., 2009; Xu et al., 2009). Vazba kaspázy-8 na mikrotubuly má i svou neapoptotickou funkci viz kapitola 6.4.4.

Indukce apoptózy je zprostředkovatelná také pomocí interakce prokaspázy-8L a membránového komplexu BAP31 (B-cell receptor-associated protein 31) endoplazmatického retikula při stimulaci E1A (early region 1A) proteinem adenoviru. Prokaspáza-8L se sem váže díky delší N-koncové doméně oproti prokaspáze-8. Navázaná prokaspáza-8L se štěpí a umožňuje aktivovat kaspázu-8 a indukovat apoptózu. (Breckenridge et al., 2002)

Také autofagosomální membrána může sloužit jako platforma k aktivaci kaspázy-8. V tomto případě se navazuje FADD a kaspáza-8 na Atg5 protein (autophagy protein 5) Atg16 a LC3 (light chain 3) struktur (Young et al., 2012). V dalším případě se může samotná kaspáza-8 oligomerozovat a aktivovat prostřednictvím proteinu p62 v reakci na inhibitor Bcl-2 a Bcl-XL zvaný ABT-263 (Huang et al., 2013).

Aktivace kaspázy-8 může probíhat i na membráně inflamazomu. Adaptorový protein inflamazomu ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) může interagovat svou Pyrin doménou s DED doménou kaspázy-8 a tak ji také aktivovat. Děje tak při absenci kaspázy-1 (Masumoto et al., 2003; Pierini et al., 2012).

### 6.3. Regulace aktivace a aktivity kaspázy-8

---

Kaspáza-8 je důležitou komponentou v apoptotické i nekroptické signalizační dráze. Způsob regulace kaspázy-8 rozhoduje, zda buňka přežije nebo bude zlikvidována apoptózou či nekroptózou.

#### 6.3.1. cFLIP

---

Asi nejvýraznějším regulátorem kaspázy-8 je molekula cFLIP. U lidí se exprimují hlavně 3 izoformy, každá s jiným regulačním účinkem rozhodujícím o přežití či smrti buňky. cFLIPL, cFLIPS a cFLIPR. cFLIPL je protein obsahující dvě DED domény a C koncovou doménu. Ta je velmi podobná kaspázové doméně, chybí jí ale katalytické místo. cFLIPS a cFLIPR mají také dvě DED domény, ale jsou kratší a již nemají C koncové domény. Všechny tyto izoformy se pomocí svých DED mohou vázat na DISC a tvořit heterodimery s prokaspázou-8. cFLIPS a cFLIPR díky chybějící kaspázové doméně úplně blokuje aktivaci prokaspázy-8 a tím i apoptózu (Krueger et al., 2001; Golks et al., 2005). cFLIPL tvoří heterodimery s prokaspázou-8 ještě lépe než samotná prokaspáza-8 své homodimery. Oproti cFLIPS a R je díky své kaspázové doméně i přes chybějící katalytickou doménu schopný neúplně aktivovat prokaspázu-8. U té proběhne autokatalylický odštěp 10p podjednotky. Takto částečně aktivovaná prokaspáza poté štěpí RIP1, čímž zamezuje indukci nekroptózy a buňka přežívá (Micheau et al., 2002). Dále je také schopna štěpit samotný cFLIPL, který pak má ještě větší účinnost při aktivaci prokaspázy-8. Ve výsledku ale aktivovaná prokaspáza-8 zůstává navázána na DISC a tak může štěpit pouze substrát v blízkém okolí. Apoptóza je tak inhibována (Yu et al., 2009; Oberst et al., 2011; Pop et al., 2011).

cFLIPu je exprimováno v každé buňce jinak a proto jsou různé reakce buňky na stejnou indukci např. ligandem smrti (Scaffidi et al., 1999). Exprese cFLIP je indukovatelná např. jeho NF- $\kappa$ B zprostředkovanou transaktivací (Tschopp & Kataoka, 2004). Pokud dojde k narušení exprese cFLIPL nebo k jeho přímé degradaci ubiquitin E3 ligázami (např. Itch), buňka je více náchylná k buněčné smrti (Chang et al., 2006).

Heterodimery cFLIPL a prokaspázy-8 jsou účinným blokátorem indukce nekroptózy, ale homodimery kaspázy-8 nekroptózu účinně potlačit nedokážou. Například u buněk typu II s blokovanou mitochondriální amplifikací apoptózy nadprodukcí anti-apoptického Bcl-XL, lze indukovat pomocí TNF $\alpha$  nekroptózu pokud je v těchto buňkách geneticky inaktivována či inhibována exprese cFLIP. Homodimerizovaná kaspáza-8 nedokáže tak účinně štěpit RIP1 a dochází k účinnější indukci nekroptózy (Oberst et al., 2011).

Jedním z virových způsobů inhibice apoptózy je inhibice apoptózy proteinem vFLIP. Ten je přítomný např. u herpes virů a podobně jako cFLIPS blokuje heterodimerizaci s prokaspázou-8 indukci apoptózy (Thome M et al., 1997).

### 6.3.2. Virové proteiny CrmA a p35

---

Dalším z virových regulátorů apoptózy je protein CrmA (cytokine response modifier A) vyskytující se u virů neštovic. Ten je schopný inhibovat nejen kaspázu-8, ale i např. kaspázu-1 (Zhou et al., 1997). CrmA inhibuje aktivní tetramerní kaspázu-8 tím, že se váže do jejího aktivního místa za vzniku komplexu CrmA a velké podjednotky. Malá podjednotka je úplně disociována (Dobó et al., 2006). CrmA je schopný inhibovat pouze aktivitu kaspázových homodimerů. Pokusné buňky s heterodimery pro-kaspázy-8 a cFlipL dále přežily i po přidání CrmA (Oberst et al., 2011).

Podobným způsobem jako CrmA je schopný inhibovat kaspázu-8 také protein p35 vyskytující se u bakulovirů. Ten je také schopný se vázat do aktivního místa kaspázy-8 a tvořit komplexy p35 proteinu a velké podjednotky (Xu et al., 2001).

### 6.3.3. Fosforylace kaspázy-8

---

Aktivita kaspázy 8 může být negativně regulována její fosforylací. U buněk s fosforylovanou kaspázou byla pozorována až inhibice indukce apoptózy.

Fosforylace byla prokázána v místě Ser364 kinázou p38-MAPK u neutrofilů (Alvarado-Kristensson et al., 2004). U neutrofilů dále v místě Tyr380 a Tyr465 může fosforylovat Lyn kináza. Jelikož mají neutrofilů krátkou životnost, jejich defosforylaci a umožnění apoptózy zajišťuje např. SHP-1 (Src-homology domain 2 containing tyrosine phosphatase-1) (Jia et al., 2008). Ve stejném místě, Tyr380, byla např. u rakovinných buněk tlustého střeva prokázána fosforylace také kinázou Src (Cursi et al., 2006). Fosforylace je možná také v místě Thr263 kinázou RSK2 (ribosomální S6 kináza 2) (Peng et al., 2011). A dále také i cyklin dependentní kinázy jako např. Cdk1/CyclinB mohou fosforylovat a inaktivovat kaspázu-8 – viz níže kapitola 6.4.2. Funkce kaspázy-8 při buněčném dělení.

Inhibice apoptózy je zdá se dána neschopností autoaktivačního štěpení u takto fosforylované kaspázy-8. U pokusu s fosforylovanou kaspázou-8 v místě Tyr380 docházelo po receptorovém stimulu ke klasickému navázání kaspázy-8 na DISC a k její homodimerizaci, dál ale již nedocházelo k aktivačnímu štěpení a kaspáza takto zůstala navázána na DISC komplexu (Powley et al., 2016).

#### 6.3.4. Ubiquitinilace a nitrosilace

---

Ubiquitinace se podílí na regulaci aktivity kaspázy-8 jak negativně, tak i pozitivně. Pozitivní vliv má nedegradační K68-ubiquitinace kaspázy-8 v DISC komplexu cullin-E3 ligázou. To umožňuje proteinu p62 interagovat s kaspázou, který tak zvyšuje autoproteolytické štěpení a uvolňování kaspázy do cytoplazmy a tím její plnou aktivaci. Při genetické inaktivaci CUL3 sice docházelo k tvoření DISC komplexu a navazování kaspázy-8, ta ale dále nebyla ubiquitinována a aktivována. Genetická inaktivace p62 zase inhibovala přímo aktivaci ubiquitinované kaspázy. Regulačně v opačném směru pracuje deubiquitináza A20, která dokáže kaspázu deubiquitinovat (Jin et al., 2009).

Naopak např. u nádorových buněk glioblastomu má ubiquitinace kaspázy-8 negativní vliv a vede k inhibici apoptózy. V tomto případě kaspáza navázaná na DISC byla K68-ubiquitinována enzymem A20 přes kinázu RIP1, což ve výsledku znemožňovalo aktivaci kaspázy-8 (Bellail et al., 2012).

Ubiquitinací je adaptorový protein a E3 ligáza TRAF2 schopný regulovat, zda buňka aktivuje apoptózu či nikoliv již při aktivní indukci apoptózy. TRAF2 již maturovanou kaspázu-8 K48-ubiquitínuje na velké podjednotce a indukuje tak její degradaci v proteazomu. Pouze při silnější indukci a vyšším množství aktivované kaspázy může dojít k apoptóze. Ubiquitinace pomocí TRAF2 tak nastavuje prahovou hodnotu pro spuštění apoptózy (Gonzalvez et al., 2012).

Ubiquitinaci v místě Thr263 indukuje kináza RSK2. Nejprve dochází k fosforylaci tohoto místa kinázou RSK2 a následně v závislosti na růstovém faktoru EGF dochází k ubiquitinaci a tak inhibici kaspázy-8 (Peng et al., 2011).

Účinně inhibovat kaspázu-8 dokáží také IAP proteinům příbuzné CARP proteiny (Caspase-8/10-associated RING proteins), které též mají aktivitu E3 ubiquitin ligázy. Ve zdravých buňkách jsou po indukci apoptózy rozštěpeny a degradovány pomocí kaspáz. Jejich nadměrná exprese byla objevena u rakovinných buněk např. dělohy, vaječnicků nebo prostaty a způsobovala degradaci kaspázy-8 i -10. Přesný mechanismus zatím není vysvětlený, ale kvůli jejich E3 aktivitě je pravděpodobné, že kaspázu-8 přímo ubiquitinují. Je také pravděpodobné, že dokáží ovlivňovat DED domény a neumožňovat navázání kaspázy na DISC. Výsledkem jejich genetické inaktivace bylo umožnění indukce apoptózy pomocí ligandů smrti (E. Robert McDonald & El-Deiry, 2004).



Dalším způsobem regulování aktivity kaspázy-8 je její modifikace oxidem dusnatým. U hepatocytů, kde je nutná amplifikace signálu přes mitochondriální dráhu, byla apoptóza úspěšně inhibována S-nitrosylací kaspázy-8, která tak po aktivaci dále neštěpila Bid protein (Kim et al., 2000).

#### 6.3.5. Mutace kaspázy-8 a epigenetická regulace její exprese

---

U buněk spinocelulárního karcinomu byly objeveny mutované kaspázy-8 v jejich stop kodonu, čímž se expresovaly delší kaspázy a buňky vykazovaly mnohem nižší citlivost na indukovanou apoptózu (Mandrizzato et al., 1997). Dalšími nalezenými mutacemi byly např. missence mutace, frame shift, nonsense mutace nebo delece. Ve všech případech měla mutace karcinogenní povahu (Teitz et al., 2000; Kim et al., 2003; Soung et al., 2005a, 2005b).

Buňky se sníženou až žádnou expresí kaspázy-8 byly objeveny např. u medulloblastomu, neuroblastomu, melanomu nebo Ewingova tumoru. Opětovná re-exprese kaspázy-8 byla pozorována po podání 5-aza-2'-deoxycytidinu, inhibitoru DNA metyltransferázy, což poukazuje na metylaci genu kaspázy-8 (Hopkins-Donaldson et al., 2000; Fulda et al., 2001; Zuzak et al., 2002). U buněk Ewingova tumoru, neuroblastomu nebo medulloblastomu, byla opětovná exprese kaspázy-8 indukovatelná IFN $\gamma$ . Zajímavé je, že k expresi kaspázy docházelo, aniž by došlo k odstranění hypermetylace jejího genu. Mechanismus je zatím neznámý, ale důležitou signální roli zde hraje fosforylace Stat1, která indukuje expresi IRF1 (Fulda & Debatin, 2002).

U medulloblastomu byla obnovena exprese kaspázy-8 také po podání IFN $\gamma$  a inhibitoru histonové deacetylázy, např. valproová kyselina nebo kyselina suberoylanilid hydroxamová. Jelikož se nezjistila žádná přímá korelace mezi acetylací histonů a expresí kaspázy-8, je možné, že je důležitá také acetylace jiných proteinů než pouze histonů (Häcker et al., 2009).

#### 6.3.6. Alternativním sestřih kaspázy-8

---

Dalším zajímavým způsobem je kaspáza-8 regulována v periferních T lymfocytech. Zde byla objevena alternativně sestřižená kaspáza-8L (long), jejíž mRNA je o 136bp delší, ale i tak nemá funkční katalytickou doménu a tak neumožňuje indukci apoptózy. Konkrétně vzniká ponechaným 8. intronem, který v sobě má stop kodon a výsledná kaspáza-8L tak neobsahuje další tři exony, které má klasicky funkční forma kaspázy. Výsledný, přibližně 32kd protein, má stále schopnost se vázat na DISC a kompetencí či heterodimerizací dokáže účinně inhibovat kaspázu-8 a indukci apoptózy. Zajímavým poznatkem je, že exprese této

izoformy je potřeba v určité míře pro normální funkci periferních lymfocytů. U pacientů se systémovým lupusem erythematoses byla zjištěna zvýšená apoptóza periferních lymfocytů a zároveň snížená exprese kaspázy-8L, která tak může zvýšenou apoptózu vysvětlovat (Horiuchi et al., 2000; Himeji et al., 2002).

Po podrobnějším prozkoumání buněk lymfoidních orgánů byla zjištěna téměř shodná míra exprese kaspázy-8 a kaspázy-8L. Pozoruhodná je evidentní možnost regulace alternativního sestříhu a tím možnost indukce apoptózy. U CD4+, CD8+ a CD19+ lymfocytů a CD14+ monocytů byl totiž pozorován pokles exprese kaspázy-8L byl po jejich aktivaci (Eckhart et al., 2001).

Další objevenou translatovanou izoformou je krátká kaspáza-8s (short). Vyskytuje se např. u leukemických HL-60 buněk, ale i zdravých např. mononukleárních buněk kostní dřene. Obsahuje pouze první DED a část druhé DED, C-koncová doména zcela chybí. I tak se dokáže vázat na FADD. Na inhibici apoptózy se ale nejspíš nepodílí, Jurkat buňky při overexpresi vykazovaly překvapivě zvýšenou citlivost na CD95 indukovanou apoptózu (Xu et al., 2009). Kaspáza-8s totiž pravděpodobně dokáže tvořit aktivační řetězce na mikrotubulech viz kapitola 6.2.4.

### 6.3.7. Kaspáza 8 a autofagie

---

U buněk kolorektálního karcinomu Bax<sup>-/-</sup> Hct116 byla zjištěna necitlivost na TRAIL indukovanou apoptózu i přes zřejmou aktivaci kaspázy-8 přes DISC. Štěpená kaspáza byla objevena v přítomnosti proteinových markerů autophagického/lysosomálního systému a byla prokázána její eliminace v lysozomech. Neštěpená kaspáza nebyla eliminována. Indukci apoptózy se podařilo vyvolat až inhibicí autofagie prostřednictvím genetické inaktivace proteinu Beclin1 nebo Vps34. Je tedy zřejmé, že i autofagie nabízí možnost regulovat indukci apoptózy (Hou et al., 2010).

Aktivovaná kaspáza-8 může naopak autofagii regulovat. Esenciální protein pro autofagii Atg3 byl objeven jako substrát aktivované kaspázy-8 a jeho štěpení až zastavovalo autofagní procesy (Oral et al., 2012).

Další regulace je také na úrovni samotné aktivace kaspázy-8 viz kapitola 6.2.5.

## 6.4. Fyziologická role a funkce kaspázy-8

---

V závislosti na regulaci zastává kaspáza-8 různé důležité role a funkce v buňce.

### 6.4.1. Role kaspázy-8 při zánětlivých procesech

---

Z předchozího popisu je zřejmé, že kaspáza-8 dokáže potlačit nekroptózu a umožnit přežití buňky. Kaspáza-8 je také zásadní při regulaci produkce cytokinů při zánětlivých procesech. Její delece u myeloidních buněk kromě autoimunitního onemocnění a zvyšuje produkci cytokinů (Cuda et al., 2015). Zároveň dochází k nekroptotické aktivaci NLRP3 inflamazomu. Při indukci především TLR3 nebo 4, a při depleci IAP může docházet k aktivaci NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3) také přítomností kaspázy-8 na ripoptozomu, která nemusí mít katalytickou aktivitu (Kang et al., 2015; Lawlor et al., 2015). Katalytická kaspáza-8 je schopná přímo aktivovat kaspázu-1 a také aktivovat interferony IL-1 $\beta$  and IL-18. (Philip et al., 2014; Moriwaki et al., 2015; Bossaller et al., 2017). Konkrétně hraje kaspáza-8 esenciální roli např. ve střevě, kde reguluje buněčnou smrt a zánět v závislosti na patogenech. (Günther et al., 2015)

### 6.4.2. Role kaspázy-8 v proliferaci a vývoji

---

Kaspáza-8 se ukázala jako důležitá komponenta při vývoji myších embryí. Její exprese u 10dpc (dní *postcoitum*) myšího embrya byla zjištěna nejvíce v povrchovém ektodermu předních i zadních končetin, bronchiálních obloučích, srdci, v oblasti spojení středního a zadního mozku a v oblasti dorzálního mesenteria. Při genetické inaktivaci kaspázy-8 myší embrya umírala nejpozději 12,5 dpc a to především kvůli špatné vaskularizaci a erytrocytóze. Erytrocytóza vznikla na základě dramatického snížení různorodosti hematopoetických prekurzorů (Varfolomeev et al., 1998). K podobnému fenotypu došlo i při genetické inaktivaci cFLIP proteinu (Yeh et al., 2000). Myší embrya se vyvinula a narodila pouze při současné genetické inaktivaci kaspázy-8 a RIP3. U těchto myší se i přes počáteční normální proliferaci T lymfocytů s věkem projevilo lymfoproliferativní onemocnění na základě výrazné akumulace T lymfocytů B220<sup>+</sup> a CD3<sup>+</sup> (Oberst et al., 2011).

To že je kaspáza-8 regulovaná pomocí cFLIPL důležitá pro samotný vývoj a zrání T lymfocytů, prokázal např. pokus na myších, kterým byl geneticky inaktivován gen pro FLIP v brzlíku. Výsledkem byla téměř naprostá nepřítomnost zralých CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů ve slezině a lymfatických uzlinách. Zralé T lymfocyty vykazovaly vyšší četnost apoptózy než kontrolní T lymfocyty (Zhang & He, 2005). U lidí konkrétně při výskytu homozygótní mutace Arg248 na Trp u kaspázy-8 dochází k defektní apoptóze a homeostázi lymfocytů a k defektní aktivaci T lymfocytů, B lymfocytů a NK lymfocytů, což vede k splenomegalii,

lymfadenopatii a imunodeficienci. To, že nedošlo k zániku embrya, jako u myší, je pravděpodobně dáno zastoupením funkce kaspázou-10 (Chun et al., 2002).

Naopak pokud je kaspáza-8 správně funkční, ale je nesprávně regulována kontinuálním výskytem cFLIPL, dochází například u B lymfocytů k vysoce maligním projevům. U těchto buněk je výskyt proteinu cFLIPL vytvářen neustálou aktivitou dráhy NfκB. Inhibicí této dráhy pomocí pevonedistatu, který inhibuje enzym NEDD8, byla dosažena účinná maturace kaspázy-8 a tak umožněná indukce apoptózy (Paiva et al., 2017). Je tedy patrné, že správná regulace kaspázy-8 a tím její vlastnost pro přežití buněk a spouštění apoptózy hraje důležitou roli nejen při vývoji embrya, správné hematopoéze a proliferaci, maturaci a aktivaci lymfocytů, ale i při udržení homeostázy.

#### 6.4.3. Funkce kaspázy-8 při buněčném dělení

Aby mohlo při buněčném cyklu dojít k mitóze bez spuštění apoptózy kaspázou-8, Cdk1/cyklin B1 fosforyluje prokaspázu-8 v místě Ser387 a pak Plk1 (polo-like kináza 1) v místě Ser305. U té pak nemůže dojít k aktivačnímu štěpení. Buňky při pokusu s nefosforylovatelnou prokaspázou-8 vykazovaly mnohem větší citlivost na CD95, TRAIL a TNFR zprostředkovanou apoptózu během mitotické fáze než s fosforylovanou prokaspázou, kde docházelo i k téměř úplnému zablokování indukce apoptózy. Snížení až zablokování indukce apoptózy tímto způsobem se vyskytuje například u rakoviny prsu. V těchto rakovinných buňkách byla zjištěna zvýšená exprese cyclin B1 proteinu a zvýšený výskyt fosforylované prokaspázy-8 než oproti zdravým buňkám. Správná funkce kaspázy-8 je tedy velmi důležitá ke správnému dělení buněk či k jejich odstranění a tak k udržení homeostázy (Matthess et al., 2010, 2014).

Mechanismus fosforylace prokaspázy-8 pomocí Cdk1/cyklin B1 se uplatňuje také při proliferaci T-lymfocytů. U periferních T-lymfocytů vystavených proliferačnímu fytohemaglutininu byla zjištěna zvýšená aktivita Cdk1/cyklin B1 a tak zvýšený výskyt fosforylované prokaspázy-8 (Matthess et al., 2010).

#### 6.4.4. Funkce kaspázy-8 při buněčné motilitě, adhezi buněčného matrix a zrání endozomu

Fosforylace prokaspázy-8 v místě Tyr380 je zdá se důležitá pro její neapoptotickou funkci zjištěnou u fibroblastů a neuroblastů a to buněčnou motilitu a adhezi k buněčné matrix. Pro tyto účely dokonce absolutně není potřeba katalytické schopnosti kaspázy či její štěpení. Pokud se totiž do buněk bez kaspázy-8 přidala neštěpitelná kaspáza-8 s inhibovanou

katalytickou aktivitou, buňky vykazovaly stejnou motilitu i buněčnou adhezi jako s přirozenou kaspázou-8. Mechanismus tohoto účinku je dán schopností takto fosforylované kaspázy interagovat s Src-homologní 2 doménou podjednotky p85 $\alpha$  kinázy PI3K (fosfatidylinositol-3 kináza) a schopností aktivovat Rac protein. U buněk, kde je motilita zajišťována prostřednictvím kalpainů byla také pozorována jejich aktivace fosforylovanou kaspázou (Helfer et al., 2006; Senft et al., 2007).

Takto fosforylovaná kaspáza-8 v interakci s podjednotkou p85 $\alpha$  má dokonce Rab-GAP aktivitu, která reguluje GTPázu Rab5, čímž se ukazuje další neapoptotická funkce kaspázy-8 a to podílení se na zrání endozomů (Torres et al., 2008).

#### 6.4.5. Funkce kaspázy-8 při buněčné diferenciaci a senescenci

---

Kaspáza-8 hraje další důležitou neapoptotickou roli a to při buněčné diferenciaci a senescenci u epitelálních, endoteliálních a myeloidních buněk. Při genetické inaktivaci kaspázy u kožních buněk myši nedocházelo ke konečné diferenciaci. Jedním z důvodů bylo odpojení mikrotubulů od centromery. Právě v centromere byly u zdravých buněk objeveny DED domény kaspázy-8. Jelikož neuroblastom může vznikat také na základě nemožnosti diferenciaci buněk, byla těmto buňkám vpravena pouze část kaspázy-8 s DED doménami. Tím došlo ke zmenšení nádoru a zastavení proliferace především přerušením cytokineze. To vše bez nutnosti proteolytické aktivity kaspázy-8 (Mielgo et al., 2009).

### 7. Kaspáza-10

---

Kaspáza-10 je vysoce homologní ke kaspáze-8. Její gen se také vyskytuje na 2. chromozomu v těsné blízkosti kaspázy-8. Obsahuje také dvě DED domény ve své prodoméně a velkou a malou podjednotku. Z nich tvoří po aktivaci tetramer a katalytické místo má formu stejného pentapeptidu QACQG (Fernandes-Alnemri et al., 1996). Díky DED se také dokáže vázat na DISC, kde dochází k její aktivaci a aktivovaná kaspáza-10 může aktivovat kaspázu-3 (Kischkel et al., 2001), ale kupodivu nemůže nahradit kaspázu-8 v aktivaci apoptózy ligandy FasL či TRAIL (Sprick et al., 2002). V lidských buňkách se ale pravděpodobně společně s kaspázou-8 podílí na štěpení proteinu Bid a to i ve své neaktivované formě (Wachmann et al., 2010). To by mohlo vysvětlovat, proč pouze mutace kaspázy-10, a ne i kaspázy-8, může způsobovat onemocnění ALPS II. typu (autoimunní lymfoproliferativní syndrom), které je způsobeno defektní apoptózou lymfocytů (Wang et al., 1999). Podrobnější informace o funkci

kaspázy-10 zatím nejsou známy. Jedním z důvodů menší informovanosti o kaspáze-10 může být nepřítomnost kaspázy-10 u myši coby modelového organismu.

## **8. Závěr**

---

Kaspáza-8 není, jak se původně myslelo, jen jednou z iniciačních kaspáza, ale tvoří regulační uzel mezi apoptózou, nekroptózou, přežitím buněk a jejich proliferací, diferenciací, vývojem a senescencí.

Pokud je apoptotická dráha funkční, tak u buněk s aktivovanými receptory smrti dochází k homodimerizaci kaspázy-8 prostřednictvím komplexu DISC či jeho obdoba a dojde k apoptóze. K aktivaci kaspázy-8 může dojít také na mitochondriální membráně, na mikrotubulech, na membráně endoplazmatického retikula, prostřednictvím Tool-like receptorů či pomocí efektorových kaspáz. Naopak k nekroptóze dochází při inhibici či poškození kaspázy-8. Pokud je ale inhibována její schopnost indukovat apoptózu za ponechání katalytické aktivity např. heterodimerizací s proteinem c-FLIPL, má takto regulovaná kaspáza-8, přesněji prokaspáza-8, schopnost potlačovat indukci nekroptózy a indukovat přežívání buňky a expresi cytokinů. Tohoto mechanismu se hojně využívá při vývoji embrya, vzniku správného hematopoetického spektra nebo vývoji, proliferaci a maturaci lymfocytů.

Kaspáza-8 může být regulována ještě před stimulací receptorů, např. fosforylací, což nejčastěji vede k nemožnosti vázat se na DISC. Tato regulace kaspázy-8 vede také k přežití buňky, ale tentokrát potlačením nadbytečné apoptózy například při buněčném dělení nebo proliferaci lymfocytů.

Důležitá je také pouhá přítomnost prokaspázy-8 v buňce, u které dokonce není nutná katalytická aktivita. Právě u diferenciaci a senescence buněk sehrává prokaspáza-8 svou roli navazováním se na mikrotubuly a tak umožnění jejich připojení k centromere. Další nekatalytická funkce kaspázy-8 se projevuje při její specifické fosforylaci, která je důležitá při buněčné motilitě, adhezi buněčného matrix a zrání endozomu. Umožňuje jí vázat se na kinázu PI3K, která hraje v těchto procesech důležitou roli.

Kaspáza-8 hraje důležitou roli také v autofagii a při zánětu. Nesprávná regulace kaspázy-8 má kromě defektů v průběhu výše zmíněných procesech i za následek vznik autoimunitních či nádorových onemocnění. Přesnější porozumění funkcím a signalizačních drah kaspázy-8 by tak mohlo přinést nové a účinnější způsoby léčby zánětlivých a autoimunitních nemocí a rakoviny.

## 9. Seznam použité literatury

---

- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N. a, Wong, W.W., & Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87**, 171.
- Alvarado-Kristensson, M., Melander, F., Leandersson, K., Rönstrand, L., Wernstedt, C., & Andersson, T. (2004) p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils. *The Journal of experimental medicine*, **199**, 449–58.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)*, **281**, 1305–8.
- Bellail, A.C., Olson, J.J., Yang, X., Chen, Z.J., & Hao, C. (2012) A20 ubiquitin ligase-mediated polyubiquitination of RIP1 inhibits caspase-8 cleavage and TRAIL-induced apoptosis in glioblastoma. *Cancer Discovery*, **2**, 140–155.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., & Salvesen, G.S. (2003) A unified model for apical caspase activation. *Molecular Cell*, **11**, 529–541.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y. V., & Wallach, D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, **85**, 803–815.
- Bossaller, L., Chiang, P.-I., Schmidt-Lauber, C., Ganesan, S., Kaiser, W.J., Rathinam, V.A., Mocarski, E.S., Subramanian, D., Green, D.R., Silverman, N., Fitzgerald, K.A., Marshak-Rothstein, A., & Latz, E. (2017) FAS mediates non-canonical IL-1 $\beta$  and IL-18 maturation via caspase-8 in a Rip3-independent manner 1. .
- Breckenridge, D.G., Nguyen, M., Kuppig, S., Reth, M., & Shore, G.C. (2002) The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 4331–6.
- Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H.-C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Wu, L.-G., & Liu, Z.-G. (2014) Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nature cell biology*, **16**, 55–65.
- Conus, S., Perozzo, R., Reinheckel, T., Peters, C., Scapozza, L., Yousefi, S., & Simon, H.-U. (2008) Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *The Journal of experimental medicine*, **205**, 685–98.
- Conus, S., Pop, C., Snipas, S.J., Salvesen, G.S., & Simon, H.U. (2012) Cathepsin D primes caspase-8 activation by multiple intra-chain proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 21142–21151.
- Cowling, V. & Downward, J. (2002) Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell death and differentiation*, **9**, 1046–1056.
- Cuda, C.M., Misharin, A. V., Khare, S., Saber, R., Tsai, F., Archer, A.M., Homan, P.J., Haines, G.K., Hutcheson, J., Dorfleutner, A., Budinger, G.R., Stehlik, C., & Perlman, H. (2015) Conditional deletion of caspase-8 in macrophages alters macrophage activation in a RIPK-dependent manner. *Arthritis Research and Therapy*, **17**, 291.
- Cursi, S., Rufini, A., Stagni, V., Condò, I., Matafora, V., Bachi, A., Bonifazi, A.P., Coppola, L., Superti-Furga, G., Testi, R., & Barilà, D. (2006) Src kinase phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression. *The EMBO journal*, **25**, 1895–1905.

- Degterev, A., Hitomi, J., Gemscheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S.M., Gerber, S.A., Lugovskoy, A., & Yuan, J. (2008) Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature chemical biology*, **4**, 313–21.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M. a, & Yuan, J. (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology*, **1**, 112–119.
- Dickens, L.S., Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Hughes, M. a., Robinson, G.L., Fairall, L., Schwabe, J.W.R., Cain, K., & MacFarlane, M. (2012) A Death Effector Domain Chain DISC Model Reveals a Crucial Role for Caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death. *Molecular Cell*, **47**, 291–305.
- Dobó, J., Swanson, R., Salvesen, G.S., Olson, S.T., & Gettins, P.G.W. (2006) Cytokine response modifier A inhibition of initiator caspases results in covalent complex formation and dissociation of the caspase tetramer. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 38781–38790.
- Donepudi, M., Sweeney, A. Mac, Briand, C., & Grütter, M.G. (2003) Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Molecular Cell*, **11**, 543–549.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, **102**, 33–42.
- E. Robert McDonald, I.I.I. & El-Deiry, W.S. (2004) Suppression of caspase-8- and -10-associated RING proteins results in sensitization to death ligands and inhibition of tumor cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 6170–6175.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., & Kaufmann, S.H. (1999) MAMMALIAN CASPASES: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*, **68**, 383–424.
- Eckhart, L., Henry, M., Santos-Beneit, a M., Schmitz, I., Krueger, a, Fischer, H., Bach, J., Ban, J., Kirchhoff, S., Krammer, P.H., Mollinedo, F., & Tschachler, E. (2001) Alternative splicing of caspase-8 mRNA during differentiation of human leukocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, **289**, 777–81.
- Estornes, Y., Toscano, F., Virard, F., Jacquemin, G., Pierrot, A., Vanbervliet, B., Bonnin, M., Lalaoui, N., Mercier-Gouy, P., Pachéco, Y., Salaun, B., Renno, T., Micheau, O., & Lebecque, S. (2012) dsRNA induces apoptosis through an atypical death complex associating TLR3 to caspase-8. *Cell death and differentiation*, **19**, 1482–94.
- Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D.P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Häcker, G., & Leverkus, M. (2011) CIAPs Block Ripoptosome Formation, a RIP1/Caspase-8 Containing Intracellular Cell Death Complex Differentially Regulated by cFLIP Isoforms. *Molecular Cell*, **43**, 449–463.
- Fernandes-Alnemri, T. (1996) The Ced-3/Interleukin 1beta Converting Enzyme-like Homolog Mch6 and the Lamin-cleaving Enzyme Mch2 $\alpha$  Are Substrates for the Apoptotic Mediator CPP32. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 27099–27106.
- Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G., & Alnemri, E.S. (1996) In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 7464–9.
- Ferreira, K.S., Kreutz, C., MacNelly, S., Neubert, K., Haber, A., Bogyo, M., Timmer, J., & Borner, C. (2012) Caspase-3 feeds back on caspase-8, Bid and XIAP in type I Fas signaling in primary mouse hepatocytes. *Apoptosis*, **17**, 503–515.



- Fuentes-Prior, P. & Salvesen, G.S. (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *The Biochemical journal*, **384**, 201–232.
- Fulda, S. & Debatin, K.-M. (2002) IFN $\gamma$  sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene*, **21**, 2295–2308.
- Fulda, S., Küfer, M.U., Meyer, E., van Valen, F., Dockhorn-Dworniczak, B., & Debatin, K.M. (2001) Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene*, **20**, 5865–5877.
- Geserick, P., Hupe, M., Moulin, M., Wong, W.W.L., Feoktistova, M., Kellert, B., Gollnick, H., Silke, J., & Leverkus, M. (2009) Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment. *Journal of Cell Biology*, **187**, 1037–1054.
- 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., Lawrence, D., Yang, B., Yee, S., Pitti, R., Marsters, S., Pham, V.C., Stephan, J.P., Lill, J., & Ashkenazi, A. (2012) TRAF2 Sets a Threshold for Extrinsic Apoptosis by Tagging Caspase-8 with a Ubiquitin Shutoff Timer. *Molecular Cell*, **48**, 888–899.
- Gonzalvez, F., Schug, Z.T., Houtkooper, R.H., MacKenzie, E.D., Brooks, D.G., Wanders, R.J.A., Petit, P.X., Vaz, F.M., & Gottlieb, E. (2008) Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. *Journal of Cell Biology*, **183**, 681–696.
- Grenet, J., Teitz, T., Wei, T., Valentine, V., & Kidd, V.J. (1999) Structure and chromosome localization of the human CASP8 gene. *Gene*, **226**, 225–232.
- Gressner, O., Schilling, T., Lorenz, K., Schulze Schleithoff, E., Koch, A., Schulze-Bergkamen, H., Lena, A.M., Candi, E., Terrinoni, A., Catani, M.V., Oren, M., Melino, G., Krammer, P.H., Stremmel, W., & Müller, M. (2005) TAp63 $\alpha$  induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *The EMBO journal*, **24**, 2458–2471.
- Grunert, M., Gottschalk, K., Kapahnke, J., Gündisch, S., Kieser, a, & Jeremias, I. (2012) The adaptor protein FADD and the initiator caspase-8 mediate activation of NF- $\kappa$ B by TRAIL. *Cell death & disease*, **3**, e414.
- Günther, C., Buchen, B., He, G.-W., Hornef, M., Torow, N., Neumann, H., Wittkopf, N., Martini, E., Basic, M., Bleich, A., Watson, A.J.M., Neurath, M.F., & Becker, C. (2015) Caspase-8 controls the gut response to microbial challenges by Tnf- $\alpha$ -dependent and independent pathways. *Gut*, **64**, 601–10.
- Häcker, S., Dittrich, A., Mohr, A., Schweitzer, T., Rutkowski, S., Krauss, J., Debatin, K.-M., & Fulda, S. (2009) Histone deacetylase inhibitors cooperate with IFN- $\gamma$  to restore caspase-8 expression and overcome TRAIL resistance in cancers with silencing of caspase-8. *Oncogene*, **28**, 3097–110.
- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., & Wang, X. (2009) Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- $\alpha$ . *Cell*, **137**, 1100–1111.
- Helfer, B., Boswell, B.C., Finlay, D., Cipres, A., Vuori, K., Tae, B.K., Wallach, D., Dorfleutner, A., Lahti, J.M., Flynn, D.C., & Frisch, S.M. (2006) Caspase-8 promotes cell motility and calpain activity under nonapoptotic conditions. *Cancer Research*, **66**, 4273–4278.
- Himeji, D., Horiuchi, T., Tsukamoto, H., Hayashi, K., Watanabe, T., & Harada, M. (2002) Characterization of caspase-8L: A novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade. *Blood*, **99**, 4070–4078.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, a, Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., & Tschopp, J. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death

- pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature immunology*, **1**, 489–495.
- Hopkins-Donaldson, S., Bodmer, J.L., Bouloud, K.B., Brognara, C.B., Tschopp, J., & Gross, N. (2000) Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer research*, **60**, 4315–9.
- Horiuchi, T., Himeji, D., Tsukamoto, H., Harashima, S., Hashimura, C., & Hayashi, K. (2000) Dominant expression of a novel splice variant of caspase-8 in human peripheral blood lymphocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, **272**, 877–81.
- Hoste, E., Kemperman, P., Devos, M., Denecker, G., Kezic, S., Yau, N., Gilbert, B., Lippens, S., De Groote, P., Roelandt, R., Van Damme, P., Gevaert, K., Presland, R.B., Takahara, H., Puppels, G., Caspers, P., Vandenabeele, P., & Declercq, W. (2011) Caspase-14 Is Required for Filaggrin Degradation to Natural Moisturizing Factors in the Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, **131**, 2233–2241.
- Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L.A., & Rabinowich, H. (2010) Autophagic degradation of active caspase-8. *Autophagy*, **6**, 891–900.
- Huang, S., Okamoto, K., Yu, C., & Sinicrope, F.A. (2013) P62/sequestosome-1 Up-regulation promotes ABT-263-induced caspase-8 aggregation/activation on the autophagosome. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 33654–33666.
- Chan, F.K.M., Shisler, J., Bixby, J.G., Felices, M., Zheng, L., Appel, M., Orenstein, J., Moss, B., & Lenardo, M.J. (2003) A Role for Tumor Necrosis Factor Receptor-2 and Receptor-interacting Protein in Programmed Necrosis and Antiviral Responses. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 51613–51621.
- Chang, D.W., Xing, Z., Capacio, V.L., Peter, M.E., & Yang, X. (2003) Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO Journal*, **22**, 4132–4142.
- Chang, L., Kamata, H., Solinas, G., Luo, J.-L., Maeda, S., Venuprasad, K., Liu, Y.-C., & Karin, M. (2006) The E3 Ubiquitin Ligase Itch Couples JNK Activation to TNF $\alpha$ -induced Cell Death by Inducing c-FLIPL Turnover. *Cell*, **124**, 601–613.
- Chen, X., Li, W., Ren, J., Huang, D., He, W.-T., Song, Y., Yang, C., Li, W., Zheng, X., Chen, P., & Han, J. (2014) Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell research*, **24**, 105–21.
- Cho, Y.S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M., & Chan, F.K.M. (2009) Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell*, **137**, 1112–1123.
- Chun, H.J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C.K., Siegel, R.M., Dale, J.K., Puck, J., Davis, J., Hall, C.G., Skoda-Smith, S., Atkinson, T.P., Straus, S.E., & Lenardo, M.J. (2002) Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature*, **419**, 395–399.
- Irmiler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E., & Tschopp, J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, **388**, 190–195.
- Jia, S.H., Parodo, J., Kapus, A., Rotstein, O.D., & Marshall, J.C. (2008) Dynamic regulation of neutrophil survival through tyrosine phosphorylation or dephosphorylation of caspase-8. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 5402–5413.
- Jin, Z., 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.
- Jouan-Lanhouet, S., Arshad, M.I., Piquet-Pellorce, C., Martin-Chouly, C., Le Moigne-Muller, G., Van Herreweghe, F., Takahashi, N., Sergent, O., Lagadic-Gossmann, D., Vandennebeele, P., Samson, M., & Dimanche-Boitrel, M.-T. (2012) TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death and Differentiation*, **19**, 2003–2014.
- Kaiser, W.J. & Offermann, M.K. (2005) Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **174**, 4942–4952.
- Kaiser, W.J., Sridharan, H., Huang, C., Mandal, P., Upton, J.W., Gough, P.J., Schon, C.A., Marquis, R.W., Bertin, J., & Mocarski, E.S. (2013) Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 31268–31279.
- Kaiser, W.J., Upton, J.W., Long, A.B., Livingston-Rosanoff, D., Daley-Bauer, L.P., Hakem, R., Casparly, T., & Mocarski, E.S. (2011) RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature*, **471**, 368–372.
- Kang, S., Fernandes-Alnemri, T., Rogers, C., Mayes, L., Wang, Y., Dillon, C., Roback, L., Kaiser, W., Oberst, A., Sagara, J., Fitzgerald, K.A., Green, D.R., Zhang, J., Mocarski, E.S., & Alnemri, E.S. (2015) Caspase-8 scaffolding function and MLKL regulate NLRP3 inflammasome activation downstream of TLR3. *Nature communications*, **6**, 7515.
- Kawasaki, T. & Kawai, T. (2014) Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, **5**, 1–8.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., & Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239–247.
- Kim, H.S., Lee, J.W., Soung, Y.H., Park, W.S., Kim, S.Y., Lee, J.H., Park, J.Y., Cho, Y.G., Kim, C.J., Jeong, S.W., Nam, S.W., Kim, S.H., Lee, J.Y., Yoo, N.J., & Lee, S.H. (2003) Inactivating mutations of caspase-8 gene in colorectal carcinomas. *Gastroenterology*, **125**, 708–715.
- Kim, S.J. & Li, J. (2013) Caspase blockade induces RIP3-mediated programmed necrosis in Toll-like receptor-activated microglia. *Cell death & disease*, **4**, e716.
- Kim, Y.-M., Kim, T.-H., Chung, H.-T., Talanian, R. V, Yin, X.-M., & Billiar, T.R. (2000) Nitric Oxide Prevents Tumor Necrosis Factor alpha – Induced Rat Hepatocyte Apoptosis by the Interruption of Mitochondrial Apoptotic Signaling Through S-Nitrosylation of Caspase-8. *Hepatology*, **32**, 770–778.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., & Ashkenazi, A. (2001) Death Receptor Recruitment of Endogenous Caspase-10 and Apoptosis Initiation in the Absence of Caspase-8. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 46639–46646.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssière, J.L., & Mignotte, B. (1995) The biochemistry of programmed cell death. *The FASEB Journal*, **9**, 1277–1287.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H., & Kirchhoff, S. (2001) Cellular FLICE-inhibitory Protein Splice Variants Inhibit Different Steps of Caspase-8 Activation at the CD95 Death-inducing Signaling Complex. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 20633–20640.
- Kumar, S. (1999) Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell death and differentiation*, **6**, 1060–1066.
- Lalaoui, N., Lindqvist, L.M., Sandow, J.J., & Ekert, P.G. (2015) The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **39**, 63–69.
- Laster, S.M., Wood, J.G., & Gooding, L.R. (1988) Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and

- necrotic forms of cell lysis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **141**, 2629–34.
- Lavrik, I., Golks, A., & Krammer, P.H. (2005) Death receptor signaling. *Journal of cell science*, **118**, 265–267.
- Lavrik, I.N. & Krammer, P.H. (2012) Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death and Differentiation*, **19**, 36–41.
- Lavrik, I.N., Mock, T., Golks, A., Hoffmann, J.C., Baumann, S., & Krammer, P.H. (2008) CD95 stimulation results in the formation of a novel death effector domain protein-containing complex. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 26401–26408.
- Lawlor, K.E., Khan, N., Mildenhall, A., Gerlic, M., Croker, B. a, D’Cruz, A. a, Hall, C., Kaur Spall, S., Anderton, H., Masters, S.L., Rashidi, M., Wicks, I.P., Alexander, W.S., Mitsuuchi, Y., Benetatos, C. a, Condon, S.M., Wong, W.W.-L., Silke, J., Vaux, D.L., & Vince, J.E. (2015) RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL. *Nature communications*, **6**, 6282.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., & Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491–501.
- Lippens, S., Kockx, M., Knaepen, M., Mortier, L., Polakowska, R., Verheyen, A., Garmyn, M., Zwijsen, A., Formstecher, P., Huylebroeck, D., Vandenabeele, P., & Declercq, W. (2000) Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ*, **7**, 1218–1224.
- Liu, B., Sun, R., Luo, H., Liu, X., Jiang, M., Yuan, C., Yang, L., & Hu, J. (2016) Both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cell death in monocytic THP-1 cells. *Immunobiology*, **88**, 1–8.
- Lockshin, R.A. & Williams, C.M. (1964) Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology*, **10**, 643–649.
- Locksley, R.M., Killeen, N., & Lenardo, M.J. (2001) The TNF and TNF Receptor Superfamilies. *Cell*, **104**, 487–501.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481–490.
- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., & Wang, X. (2000) Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol*, **2**, 754–761.
- Mandruzzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T., & van der Bruggen, P. (1997) A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med*, **186**, 785–793.
- Martin, D.A., Siegel, R.M., Zheng, L., & Lenardo, M.J. (1998) Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACH $\alpha$ 1) death signal. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 4345–9.
- Masumoto, J., Dowds, T.A., Schaner, P., Chen, F.F., Ogura, Y., Li, M., Zhu, L., Katsuyama, T., Sagara, J., Taniguchi, S., Gumucio, D.L., Núñez, G., & Inohara, N. (2003) ASC is an activating adaptor for NF- $\kappa$ B and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **303**, 69–73.
- Matsumura, H., Shimizu, Y., Ohsawa, Y., Kawahara, A., Uchiyama, Y., & Nagata, S. (2000) Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *Journal of Cell Biology*, **151**, 1247–1255.

- Matthess, Y., Raab, M., Knecht, R., Becker, S., & Strebhardt, K. (2014) Sequential Cdk1 and Plk1 phosphorylation of caspase-8 triggers apoptotic cell death during mitosis. *Molecular Oncology*, **8**, 596–608.
- Matthess, Y., Raab, M., Sanhaji, M., Lavrik, I.N., & Strebhardt, K. (2010) Cdk1/cyclin B1 controls Fas-mediated apoptosis by regulating caspase-8 activity. *Molecular and cellular biology*, **30**, 5726–5740.
- McIlwain, D.R., Berger, T., & Mak, T.W. (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**, 1–28.
- Mielgo, A., Torres, V.A., Schmid, M.C., Graf, R., Zeitlin, S.G., Lee, P., Shields, D.J., Barbero, S., Jamora, C., & Stupack, D.G. (2009) The death effector domains of caspase-8 induce terminal differentiation. *PLoS ONE*, **4**, 1–9.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C., & Grütter, M.G. (2002) The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 45162–71.
- Micheau, O. & Tschopp, J. (2003) Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell*, **114**, 181–190.
- Moriwaki, K., Bertin, J., Gough, P.J., & Chan, F.K.-M. (2015) A RIPK3–Caspase 8 Complex Mediates Atypical Pro–IL-1 $\beta$  Processing. *The Journal of Immunology*, **194**, 1938–1944.
- Murphy, B.M., Creagh, E.M., & Martin, S.J. (2004) Interchain proteolysis, in the absence of a dimerization stimulus, can initiate apoptosis-associated caspase-8 activation. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 36916–36922.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., Rourke, K.O., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., & Dixit, V.M. (1996) FLICE, A Novel FADD-Homologous ICE / CED-3 – like Protease, Is Recruited to the CD95 ( Fas / APO-1 ) Death-Inducing Signaling Complex. *Cell*, **85**, 817–827.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., & Dixit, V.M. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 2926–2930.
- O’Donnell, M.A., Legarda-Addison, D., Skountzos, P., Yeh, W.C., & Ting, A.T. (2007) Ubiquitination of RIP1 Regulates an NF- $\kappa$ B-Independent Cell-Death Switch in TNF Signaling. *Current Biology*, **17**, 418–424.
- Oberst, A., Dillon, C.P., Weinlich, R., McCormick, L.L., Pop, C., Hakem, R., Salvesen, G.S., & Green, D.R. (2011) Catalytic activity of the caspase-8-FLIPL complex inhibits RIPK3-dependent Necrosis. **471**, 363–367.
- Oral, O., Oz-Arslan, D., Itah, Z., Naghavi, A., Deveci, R., Karacali, S., & Gozuacik, D. (2012) Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis*, **17**, 810–820.
- Orrenius, S., Nicotera, P., & Zhivotovsky, B. (2011) Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicological Sciences*, **119**, 3–19.
- Paiva, C., Godbersen, J.C., Rowland, T., Danilova, O. V, Danes, C., Berger, A., & Danilov, A. V (2017) Pevonedistat, a Nedd8-activating enzyme inhibitor, sensitizes neoplastic B-cells to death receptor-mediated apoptosis. *Oncotarget*, **8**, 21128–21139.
- Peng, C., Cho, Y.Y., Zhu, F., Zhang, J., Wen, W., Xu, Y., Yao, K., Ma, W.Y., Bode, A.M., & Dong, Z. (2011) Phosphorylation of caspase-8 (Thr-263) by ribosomal S6 kinase 2 (RSK2) mediates caspase-8 ubiquitination and stability. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 6946–6954.

- Philip, N.H., Dillon, C.P., Snyder, A.G., Fitzgerald, P., Wynosky-Dolfi, M.A., Zwack, E.E., Hu, B., Fitzgerald, L., Mauldin, E.A., Copenhaver, A.M., Shin, S., Wei, L., Parker, M., Zhang, J., Oberst, A., Green, D.R., & Brodsky, I.E. (2014) Caspase-8 mediates caspase-1 processing and innate immune defense in response to bacterial blockade of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 7385–7390.
- Pierini, R., Juruj, C., Perret, M., Jones, C.L., Mangeot, P., Weiss, D.S., & Henry, T. (2012) AIM2/ASC triggers caspase-8-dependent apoptosis in Francisella-infected caspase-1-deficient macrophages. *Cell death and differentiation*, **19**, 1709–21.
- Pop, C., Oberst, A., Drag, M., Van Raam, B.J., Riedl, S.J., Green, D.R., & Salvesen, G.S. (2011) FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity. *The Biochemical journal*, **433**, 447–57.
- Powley, I.R., Hughes, M.A., Cain, K., & MacFarlane, M. (2016) Caspase-8 tyrosine-380 phosphorylation inhibits CD95 DISC function by preventing procaspase-8 maturation and cycling within the complex. *Oncogene*, **35**, 1–12.
- Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., & Gabai, V.L. (2003) Necrosis: A specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research*, **283**, 1–16.
- Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Hadano, S., et al. (1998) Cell death attenuation by “Usurpin”, a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell death and differentiation*, **5**, 271–288.
- Renatus, M., Stennicke, H.R., Scott, F.L., Liddington, R.C., & Salvesen, G.S. (2001) Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 14250–5.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M., & Venkatachalam, M. a. (1999) Apoptosis: Definition, mechanisms, and relevance to disease. *American Journal of Medicine*, **107**, 489–506.
- Sakamaki, K., Imai, K., Tomii, K., & Miller, D.J. (2015) Evolutionary analyses of caspase-8 and its paralogs: Deep origins of the apoptotic signaling pathways. *BioEssays*, **37**, 767–776.
- Sakamaki, K. & Satou, Y. (2009) Caspases: Evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *Journal of Fish Biology*, **74**, 727–753.
- Sakata, S.I., Yan, Y., Satou, Y., Momoi, A., Ngo-Hazelett, P., Nozaki, M., Furutani-Seiki, M., Postlethwait, J.H., Yonehara, S., & Sakamaki, K. (2007) Conserved function of caspase-8 in apoptosis during bony fish evolution. *Gene*, **396**, 134–148.
- Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, **91**, 443–446.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K., Krammer, P.H., & Peter, M.E. (1998) Two CD95 ( APO-1 / Fas ) signaling pathways. *EMBO Journal*, **17**, 1675–1687.
- Scaffidi, C., Medema, J.P., Krammer, P.H., & Peter, M.E. (1997) FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 26953–26958.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., & Peter, M.E. (1999) The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 1541–1548.
- Scott, F.L., Stec, B., Pop, C., Dobaczewska, M.K., Lee, J.J., Monosov, E., Robinson, H., Salvesen, G.S., Schwarzenbacher, R., & Riedl, S.J. (2009) The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature*, **457**, 1019–22.
- Senft, J., Helfer, B., & Frisch, S.M. (2007) Caspase-8 interacts with the p85 subunit of

- phosphatidylinositol 3-kinase to regulate cell adhesion and motility. *Cancer Research*, **67**, 11505–11509.
- Shi, Y. (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell*, **9**, 459–470.
- Schleich, K., Warnken, U., Fricker, N., Öztürk, S., Richter, P., Kammerer, K., Schnölzer, M., Krammer, P.H., & Lavrik, I.N. (2012) Stoichiometry of the CD95 Death-Inducing Signaling Complex: Experimental and Modeling Evidence for a Death Effector Domain Chain Model. *Molecular Cell*, **47**, 306–319.
- Slee, E.A., Adrain, C., & Martin, S.J. (2001) Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 7320–7326.
- Soung, Y.H., Lee, J.W., Kim, S.Y., Jang, J., Park, Y.G., Park, W.S., Nam, S.W., Lee, J.Y., Yoo, N.J., & Lee, S.H. (2005a) CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. *Cancer research*, **65**, 815–21.
- Soung, Y.H., Lee, J.W., Kim, S.Y., Sung, Y.J., Park, W.S., Nam, S.W., Kim, S.H., Lee, J.Y., Yoo, N.J., & Lee, S.H. (2005b) Caspase-8 gene is frequently inactivated by the frameshift somatic mutation 1225\_1226delTG in hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, **24**, 141–147.
- 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. *The EMBO journal*, **21**, 4520–30.
- Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H., & Walczak, H. (2000) FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, **12**, 599–609.
- Strasser, A. (2005) The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature reviews. Immunology*, **5**, 189–200.
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., & Wang, X. (2012) Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, **148**, 213–227.
- Sun, R., Zhang, Y., Lv, Q., Liu, B., Jin, M., Zhang, W., He, Q., Deng, M., Liu, X., Li, G., Li, Y., Zhou, G., Xie, P., Xie, X., Hu, J., & Duan, Z. (2011) Toll-like Receptor 3 (TLR3) Induces Apoptosis via Death Receptors and Mitochondria by Up-regulating the Transactivating p63 Isoform (TAP63). *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 15918–15928.
- Sun, X., Yin, J., Starovasnik, M.A., Fairbrother, W.J., & Dixit, V.M. (2002) Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 9505–9511.
- Teitz, T., Wei, T., Valentine, M.B., Vanin, E.F., Grenet, J., Valentine, V. a, Behm, F.G., Look, a T., Lahti, J.M., & Kidd, V.J. (2000) Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nature medicine*, **6**, 529–535.
- Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K., & Meier, P. (2011) The Ripoptosome, a Signaling Platform that Assembles in Response to Genotoxic Stress and Loss of IAPs. *Molecular Cell*, **43**, 432–448.
- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schröter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, & Tschopp J (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, **386**, 517–521.

- Thornberry, N.A. & Molineaux, S.M. (2008) Interleukin-1 $\beta$  converting enzyme: A novel cysteine protease required for IL-1 $\beta$  production and implicated in programmed cell death. *Protein Science*, **4**, 3–12.
- Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T., & Nicholson, D.W. (1997) A Combinatorial Approach Defines Specificities of Members of the Caspase Family and Granzyme B: FUNCTIONAL RELATIONSHIPS ESTABLISHED FOR KEY MEDIATORS OF APOPTOSIS. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 17907–17911.
- Torres, V.A., Mielgo, A., Barilà, D., Anderson, D.H., & Stupack, D. (2008) Caspase 8 promotes peripheral localization and activation of Rab5. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 36280–36289.
- Tschopp, J. & Kataoka, T. (2004) N-Terminal Fragment of c-FLIP(L) Processed by Caspase 8 Specifically Interacts with TRAF2 and Induces Activation of the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, **24**, 2627–2636.
- Upton, J.W., Kaiser, W.J., & Mocarski, E.S. (2012) DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell Host and Microbe*, **11**, 290–297.
- Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A. V., Dynek, J.N., Zobel, K., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., & Vucic, D. (2008) c-IAP1 and c-IAP2 Are Critical Mediators of Tumor Necrosis Factor (TNF $\alpha$ )-induced NF- $\kappa$ B Activation. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 24295–24299.
- 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. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 40599–608.
- Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K.B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., & Wallach, D. (1998) Targeted Disruption of the Mouse Caspase 8 Gene Ablates Cell Death Induction by the TNF Receptors, Fas/Apo1, and DR3 and Is Lethal Prenatally. *Immunity*, **9**, 267–276.
- Vogt, C. (1842) *Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte*. Jent & Gassmann,
- Wachmann, K., Pop, C., Van Raam, B.J., Drag, M., MacE, P.D., Snipas, S.J., Zmasek, C., Schwarzenbacher, R., Salvesen, G.S., & Riedl, S.J. (2010) Activation and specificity of human caspase-10. *Biochemistry*, **49**, 8307–8315.
- Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L.F., Wang, F.S., & Wang, X. (2014) Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. *Molecular Cell*, **54**, 133–146.
- Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F.K.M., Dale, J., Sneller, M., Yao, X., Puck, J.M., Straus, S.E., & Lenardo, M.J. (1999) Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*, **98**, 47–58.
- Wang, L., Du, F., & Wang, X. (2008) TNF- $\alpha$  Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways. *Cell*, **133**, 693–703.
- Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, **15**, 2922–2933.
- Wejda, M., Impens, F., Takahashi, N., Van Damme, P., Gevaert, K., & Vandenabeele, P. (2012) Degradomics reveals that cleavage specificity profiles of caspase-2 and effector caspases are



- alike. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 33983–33995.
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., & Kluck, R.M. (2011) Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1813**, 521–531.
- Wolf, B.B. & Green, D.R. (1999) Suicidal tendencies: Apoptotic cell death by caspase family proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 20049–20052.
- Xu, G., Cirilli, M., Huang, Y., Rich, R.L., Myszka, D.G., & Wu, H. (2001) Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. *Nature*, **410**, 494–497.
- Xu, Z., Tang, K., Wang, M., Rao, Q., Liu, B., & Wang, J. (2009) A new caspase-8 isoform caspase-8s increased sensitivity to apoptosis in jurkat cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2009**, .
- Yeh, W.C., Itie, a, Elia, a J., Ng, M., Shu, H.B., Wakeham, a, Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D. V, & Mak, T.W. (2000) Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*, **12**, 633–642.
- Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., & Korsmeyer, S.J. (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, **400**, 886–891.
- Young, M.M., Takahashi, Y., Khan, O., Park, S., Hori, T., Yun, J., Sharma, A.K., Amin, S., Hu, C.D., Zhang, J., Kester, M., & Wang, H.G. (2012) Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 12455–12468.
- Yu, J.W., Jeffrey, P.D., & Shi, Y. (2009) Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 8169–8174.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., & Horvitz, H.R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, **75**, 641–652.
- Zamaraev, A. V, Kopeina, G.S., Zhivotovsky, B., & Lavrik, I.N. (2015) Cell death controlling complexes and their potential therapeutic role. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **72**, 505–17.
- Zhang, N. & He, Y. (2005) An essential role for c-FLIP in the efficient development of mature T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, **202**, 395–404.
- Zhao, J., Jitkaew, S., Cai, Z., Choksi, S., Li, Q., Luo, J., & Liu, Z.-G.Z.-G. (2012) Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 5322–7.
- Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V.M., & Salvesen, G.S. (1997) Target Protease Specificity of the Viral Serpin CrmA. ANALYSIS OF FIVE CASPASES. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7797–7800.
- Zuzak, T.J., Steinhoff, D.F., Sutton, L.N., Phillips, P.C., Eggert, A., & Grotzer, M.A. (2002) Loss of caspase-8 mRNA expression is common in childhood primitive neuroectodermal brain tumour/medulloblastoma. *European Journal of Cancer*, **38**, 83–91.